

**Die klinische Bedeutung des humanen Boca Virus:
Eine retrospektive Untersuchung, eine prospektive Studie
und eine matched pairs Analyse**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Dennis Klinkenberg
aus Westerstede
2010

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Oliver Schildgen
2. Gutachter: Professor Dr. med. Jürgen Rockstroh

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.03.2010

Aus dem Institut für Virologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Professor Dr. med. Christian Drosten

Für meine Eltern,
meine Großmutter
und Frau Schüttforth

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung und virologische Grundlagen	9
1.1 Ziel der Arbeit	9
1.2 Klinische Bedeutung von Atemwegsinfektionen	10
1.3 Parvovirinae	11
1.4 Das canine Parvovirus (CPV)	13
1.5 Das Minute Virus of Canine (MVC)	14
1.6 Das bovine Parvovirus (BPV)	15
1.7 Das humane Bocavirus (hBoV)	15
1.8 Das Respiratorische Synzytial Virus (RSV)	17
1.9 Fragestellung	18
2. Materialien und Methoden	20
2.1 Kits und Feinchemikalien	20
2.2 Technische Geräte	21
2.3 Rachenspülwassergewinnung	22
2.4 Gewinnung der DNA	22
2.5 Vorbereitung der Polymerasenkettenreaktion (PCR)	23
2.6 PCR	24
2.7 Gelelektrophorese, Einfärbung und Fotodokumentation	25
2.8 Definitionen	25
2.9 Statistische Methoden und Matched Pairs Analyse	26
2.10 Diagnostik der Koinfektionen	27
3. Ergebnisse	29
3.1 Ergebnisse der experimentellen Untersuchung	29
3.1.1 Häufigkeit hBoV Infektion und Grundcharakteristik der Patienten	31
3.1.2 Symptome und Laborbefunde	32
3.1.3 Radiologische Befunde	33
3.1.4 McIntosh-Score, Krankheitsverlauf und Therapien	34

3. 1. 5 Risikofaktoren und Koinfektionen in der Patientengruppe	34
3. 2 Ergebnisse der prospektiven Studie	35
3. 2. 1 Häufigkeit hBoV Infektion und Grundcharakteristik der Patienten	35
3. 2. 2 Symptome und Laborbefunde	36
3. 2. 3 Radiologische Befunde	37
3. 2. 4 McIntosh-Score, Krankheitsverlauf und Therapien	37
3. 2. 5 Risikofaktoren und Koinfektionen in der Patientengruppe	37
3. 3 Matched Pairs Analyse	38
3. 3. 1 Symptome und Diagnosen	39
3. 3. 2 Therapeutische Interventionen	41
4. Diskussion	44
4. 1 hBoV: Ursache von Atemwegsinfektionen oder nur ein Zufallsfund?	44
4. 2 Prävalenz	45
4. 3 Saisonalität	46
4. 4 Klinische Symptomatik	47
4. 5 Radiologische Befunde	48
4. 6 Akute Obstruktionen und Asthma bronchiale	50
4. 7 Laborbefunde	50
4. 8 Koinfektionen	51
4. 9 Therapeutische Intervention	52
4. 10 Schlussfolgerung	54
4. 11 Ausblick	54
5. Zusammenfassung	56
6. Schlussbemerkungen	57
6. 1 Kenntlichmachung nicht eigener Leistungen	57
6. 2 Publierte Arbeiten	57
6. 3 Limitation der Studien	57

6. 4 Rechtliche Hinweise	58
Anhang	
Verzeichnis der Abbildungen	59
Verzeichnis der Tabellen	60
7. Literaturverzeichnis	61
Danksagungen	70

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno assoziierte Viren
AZ	Allgemeinzustand
AOM	Akute Otitis Media
BPV	Bovines Parvovirus
CLD	Bronchopulmonale Dysplasie
COPD	Chronische Obstruktive Lungenerkrankung
CPAP	Kontinuierliche Atemunterstützung mit geregelter Spitzendruck
CPV	Canines Parvovirus
CPV 1	Canines Parvovirus 1 (identisch mit MVC)
CPV 2	Canines Parvovirus 2 (identisch mit CPV)
CRP	C reaktives Protein
CXR	Röntgenaufnahme des Thorax
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FPV	Felines Leukoplakievirus
HADEN	Hemabsorbierender enterischer Virus
hBoV	Humanes Boca Virus
hBoV+	Positiver hBoV DNA Befund
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
HMPV	Humanes Metapneumovirus
MVC	Minute Virus des Hundes
NPA	Nasopharyngeales Aspirat
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PVM	Pneumonie Virus der Maus
RSV	Humanes Respiratorisches Synzytial Virus
RSV+	Positiver RSV DNA Befund
RSW	Rachenspülwasser
SSW	Schwangerschaftswochen
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung und virologische Grundlagen

1.1 Ziel der Arbeit

Infektionen der unteren Atemwege (Bronchiolitis und Pneumonie) gehören zu den häufigsten, zum Tode führenden Infektionskrankheiten weltweit. Insbesondere Neugeborene, Säuglinge, Kleinkinder und Menschen über 65 Jahre, sind durch Erreger respiratorischer Infektionen bedroht. Ein erheblicher Anteil aller akuten Infektionen der Atemwege bei Kindern wird durch virale Infektionserreger ausgelöst (Arden et al., 2006).

Im Kontext der SARS Epidemie (schweres akutes Atemwegssyndrom) 2002 und der Beschreibung des SARS-assoziierten Coronavirus, ist die Bedeutung neu entdeckter Infektionskrankheiten (emerging infectious diseases) auf dem Gebiet der Atemwegserkrankungen in das breite Bewusstsein der Öffentlichkeit gelangt (Drosten, et al., 2003). Zu den ‚emerging respiratory pathogens‘ gehört auch das im Jahr 2005 entdeckte humane Bocavirus, kurz hBoV genannt (Allander et al., 2005; Allander 2007).

In dieser Promotionsschrift wurden retrospektiv tiefgefrorene Rachenspülwasser-Proben (Nasopharyngeal Aspirate; NPA) aus den Jahren 2002 bis 2005 mittels einer standardisierten PCR-Methode auf das Vorkommen von hBoV DNA untersucht. Die Proben stammen von symptomatischen Kindern, die mit Infektionszeichen der Atemwege in der Kinderklinik der Universität Bonn behandelt wurden. Solche Proben werden nach Abschluss der Akutdiagnostik für mindestens 5 Jahre aufbewahrt um zukünftigen Forschungsarbeiten zur Verfügung zu stehen. In einer zweiten, prospektiven Studie wurden NPA-Proben von Patienten des Zentrums für Kinderheilkunde, die in der Winterperiode 2005/2006 Symptome einer Infektion der unteren Atemwege zeigten, auf hBoV untersucht.

Anschließend wurde ein Kollektiv allein mit hBoV infizierter Patienten aus den beiden Studien in einer matched pairs Analyse mit einer Patientenkohorte verglichen, bei der eine gesicherte Infektion durch das Respiratorische Synzytial Virus (RSV) bestand. Neben der Beschreibung klinischer und radiologischer Merkmale der hBoV-Infektion soll auf diese Weise die klinische Bedeutung der hBoV-Infektion mit der RSV-Infektion verglichen werden.

1. 2 Klinische Bedeutung von Atemwegsinfektionen

Das RSV ist einer häufigsten Erreger von Atemwegsinfektionen bei Säuglingen und Kleinkindern. Mindestens 2,5 % aller kumulativen Kosten des Gesundheitssystems werden durch virale Infektionen der unteren Atemwege verursacht (McConnochie et al., 1988).

Sowohl die passive Exposition gegenüber Tabakrauch in der Familie als auch die Exposition gegenüber anderen Umwelttoxinen in der Atemluft machen Kinder empfänglicher für Atemwegsinfektionen (Klig u. Chen, 2003).

Alleine auf Grund von RSV Infektionen erfolgen jährlich ungefähr ca. 12000 Krankenhauseinweisungen in den Vereinigten Staaten (Welliver, 2003).

Zehn Prozent aller Kinder und 5 bis 10 % aller Erwachsenen leiden in westlichen Industrienationen unter Asthma bronchiale. Zudem steigt die Prävalenz der nicht durch Asthma bedingten chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (COPD) stetig und die WHO prognostiziert, dass die COPD 2020 zur dritthäufigsten Todesursache weltweit werden wird (Johnston, 2005).

Die Bedeutung von viralen Infektionen der Atemwege im Kindesalter für die Entstehung von Asthma wird zurzeit kontrovers diskutiert (Pérez et al., 2007; Gern, 2004). Kinder, die im Säuglingsalter eine schwere RSV Infektion durchmachen, haben in den darauf folgenden 8 bis 13 Jahren ein erhöhtes Risiko für behandlungsbedürftige rezidivierende Episoden mit Bronchialobstruktion (Welliver, 2003). Des Weiteren zeigen bis zu 70 % aller im Kleinkindalter mit RSV infizierten Kinder noch bis zu 10 Jahre später eine erhöhte Empfindlichkeit der Atemwege (untersucht im Metacholin-Provokationstest) und eine gestörte Lungenfunktion (Klig u. Chen, 2003).

Virale Infektionen der Atemwege sind wichtige Auslöser von akuten Exazerbationen bei Patienten mit Asthma bronchiale oder COPD. Da die akuten Exazerbationen mit der größten Morbidität und Mortalität in dieser Patientengruppe verbunden sind, muss man den Atemwegsviren zumindest für den Verlauf und den Ausgang dieser Erkrankungen eine enorme Bedeutung zumessen, auch wenn die Rolle für die Entstehung dieser Erkrankungen weiter strittig bleibt. Die Standardtherapie solcher Exazerbationen ist - ebenso wie die in diesem Zusammenhang zu häufig verordneten Antibiotika - unwirksam gegen das auslösende Virus (Johnston, 2005).

Zumindest das RSV und möglicherweise auch das hBoV, sind Auslöser von fieberhaften Infektionen der oberen Luftwege bei Erwachsenen, die jährlich mit hohen Kosten durch

Arbeitsausfälle, für Medikamente sowie Arztkonsultationen verbunden sind (Hashem u. Hall, 2003).

Dies veranschaulicht die enorme Bedeutung der Infektionen der unteren Atemwege und die Notwendigkeit, sich in der medizinischen Grundlagenforschung mit neu entdeckten Atemwegsviren zu beschäftigen.

1.3 Parvovirinae

Die Virusunterfamilie der Parvovirinae galt lange Zeit als Familie ausschließlich tierpathogener Viren. Die Unterfamilie Parvovirinae unterteilt sich in die Genus Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus und Bocavirus.

Parvoviren gehören zu den kleinsten DNA Viren. Das Virion hat durchschnittlich einen Durchmesser von 18 bis 26 nm und besteht ausschließlich aus Protein und DNA. Die Unterfamilie lässt sich grob in autonome Parvoviren (die Genus Parvovirus, Erythrovirus und Bocavirus) und Dependoviren unterteilen. Dependoviren, auch als Adeno-assoziierte Viren (AAV) beschrieben, benötigen immer eine Koinfektion mit einem Helfervirus, entweder Adenoviren oder Herpesviren (Berns u. Parish, 2007; Lederman et al., 1983).

Alle Parvoviren tragen einen DNA Einzelstrang, entweder negativ oder positiv gerichtet und besitzen keine Hülle. Das komplette Genom ist ungefähr 4000-6000 Nukleotide lang (Allander et al, 2005; 2007).

Die ersten Vertreter wurden kurz nach Ende des Zweiten Weltkriegs bei nervenkranken Katzen entdeckt und wegen ihrer Größe mit parvo (parvus lateinisch für klein) bezeichnet. 60 Kapsomere bilden einen Ikosaeder als Kapsid mit der Triangulationszahl $T = 1$, also einen regelmäßigen Zwanzigflächner. Das Massenverhältnis DNA zu Proteinen ist ungefähr 1:1. Durch diese Eigenschaften ist das Virion äußerst stabil und gilt als sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen. Für einzelne Vertreter ist eine Stabilität im pH Bereich von 3 bis 9 bei 56 °C für 60 Minuten nachgewiesen (Berns u. Parish, 2007).

Dieser Stabilität ist wahrscheinlich die Eigenschaft zu verdanken, die zumindest für einige Vertreter nachgewiesen ist, ein Leben lang im Körper des Wirtes persistieren zu können (Manning et al., 2007). In der Transfusionsmedizin und in der Biotechnologie sind Parvovirinae als mögliche, schwer zu kontrollierende Verunreinigungen bekannt. Weitere Forschung muss zeigen, ob hier eine bedeutende Infektionsgefahr für Empfänger von Blutprodukten besteht (Freyer et al., 2006).

Parvoviren replizieren im Nukleus infizierter Zellen. Damit das Virus replizieren kann, muss die infizierte Zelle in die S-Phase eingehen. Anders als andere Viren, können Parvoviren sich in ruhenden Wirtszellen nicht vermehren (Lederman et al., 1983).

1974 entdeckte Yvonne Cossart eher zufällig das Parvovirus B19, das zum Genus Erythrovirus gehört (Cossart et al., 1975). Dieses Virus ist der Erreger der Ringelröteln (Erythema infectiosum). Ringelröteln ist eine weltweit verbreitete Kinderkrankheit, die auch junge Erwachsene befallen kann. Ungefähr 60 % aller Erwachsenen in Mitteleuropa haben Antikörper gegen diesen Virus. Die Krankheit verläuft meistens selbst limitierend mit typischen Exanthenen, Fieber, Schmerzen und eher leichten Symptomen über höchstens drei Wochen. Das Virus dringt über Tröpfcheninfektion in die Atemwege ein und disseminiert auf dem Blutweg. Es ist beschrieben, dass das Virus das Knochenmark infizieren und dort die Erythroblasten zerstören kann. Für die Krankheit ist eine saisonale Häufung im Frühjahr beschrieben. Die Krankheit macht nur selten Komplikationen, unter anderem bei Patienten mit chronischen Störungen des Blutbildungssystems oder Immunschwäche und steht mit Spontanaborten in Zusammenhang. Die Rolle des Parvovirus B19 bei der Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie z.B. Arthritis oder Myokarditis ist nicht restlos geklärt (Manning et al., 2007; Eis-Hübinger et al., 1998).

Neben diesen beiden Viren wurde der Unterfamilie der Parvovirinae bis 2005 aus Sicht des Humanmediziners eher wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

2005 wurden kurz hintereinander zwei neue Viren, die zur Unterfamilie der Parvovirinae gehören, entdeckt. Zum einen das humane Bocavirus, mit dem sich diese Arbeit ausführlich beschäftigt und ein als PARV4 bezeichnetes Virus. PARV4 wurde im Serum von Patienten mit Zeichen eines akuten Virusinfektes gefunden: Müdigkeit, Unbehagen, Nachtschweiß und Kopfschmerzen. Die Patienten befürchteten sich eine HIV Infektion zugezogen zu haben und wurden deswegen in der Klinik vorstellig (Jones et al., 2005). In den ersten Untersuchungen zu diesem Virus fällt auf, dass es gehäuft als Koinfektion im Rahmen einer Hepatitis B Infektion vorkommt. Die genauere Erforschung und klinische Einordnung dieses Virus steht noch aus (Freyer et al., 2006;2007).

In der Veterinärmedizin haben die Parvoviren schon seit langem enorme Bedeutung. Wie schon erwähnt, gibt es Parvoviren des Hundes und des Rindes. Daneben sind spezifische Parvoviren der Ratte, Maus, Katze, Schwein, Nerz und des Waschbären bekannt, die sich alle nur wenig in ihrer

Nukleinsäuresequenz unterscheiden. In den meisten Fällen sind sie für ernste, wenn unbehandelt, für das Tier oft tödlich verlaufende Krankheiten verantwortlich (Berns u. Parish, 2007).

1. 4 Das canine Parvovirus (CPV)

Das canine Parvovirus (CPV) wird auch als canines Parvovirus 2 (CPV 2) bezeichnet. Es gehört nicht zum Genus Bocavirus sondern zum Genus Parvovirus. Auch wenn hBoV dem Minute Virus of Canine (MVC) genetisch ähnlicher ist und mit diesem deshalb in einem Genus zusammengefasst wird, lohnt sich die kurze Betrachtung: zum einen wegen der herausragenden Bedeutung CPVs für die Tiermedizin, zum anderen, da CPV als Modellvirus einer Parvovirusinfektion gelten kann.

1978 berichteten Thomson und Gagnon über eine neue Krankheit unter Hunden in Kanada, die sich epidemisch von Ontario aus über das ganze Bundesgebiet ausbreitete (Thomson u. Gagnon, 1978). Die klinischen Symptome waren vor allem wässrige Durchfälle und blutiges Erbrechen, die in der Hälfte der Fälle zum Tod führten. Als Therapie stand damals nur eine ausgedehnte Volumensubstitution zur Verfügung, die in manchen Fällen eine Erholung des Hundes zur Folge hatte. Die Krankheit befiel Hunde jeglichen Alters und Rasse. In histologischen Proben des Gastrointestinaltrakts wurden Läsionen im intestinalen Epithel, die zum Kollaps der Mukosa führten, gefunden. Das Virus scheint insbesondere die Krypten der Magenschleimhaut zu befallen.

Da die Krankheit einer bekannten Katzenkrankheit, der felines Leukoplakie (FPV), die von einem Parvovirus verursacht wird, ähnelt, wurde mittels Elektronenmikroskopie nach einem Parvovirus gesucht.

Kurz darauf wurde der eindeutige Zusammenhang zwischen einer Aufnahme des Virus und der Entstehung einer Gastroenteritis bei Hunden bewiesen (Gagnon u. Povey, 1979).

Für das canine Parvovirus wurde das erste Mal beschrieben, was heute als typisch für alle Parvoviren angesehen wird: Das Virus benötigt zur Replikation sich teilende Zellen. Das Virus selber hat keinen Mechanismus um eine Zelle zur Zellteilung anzuregen. Dadurch erklärt sich der bevorzugte Befall der Magenschleimhaut und insbesondere der Krypten, da sich physiologisch hier ständig viele Zellen im Stadium der Teilung befinden (Carman u. Povey, 1982).

Dies erklärt, warum CPV Infektionen bei Welpen und trächtigen Hunden oft schlimmere Verläufe haben und hier unter anderem Myokarditiden sowie zum Abort führende intrauterine Infektionen beschrieben sind. Im noch nicht vollständig entwickelten Organismus befinden sich

viele Zelllinien in ständiger Zellteilung und bieten damit dem Virus eine ideale Replikationsgrundlage.

Neben dem Gastrointestinaltrakt, gelten das lymphatische System und das Knochenmark als bevorzugte Ziel-Gewebe für CPV.

Studien legen nahe, dass das canine Parvovirus und Parvovirinae generell sehr spezifisch für Gewebe und Tierarten sind. Das canine Parvovirus kann zwar auch Katzen infizieren, infiziert dort aber dann eher untypische Gewebe. Im Gegensatz dazu kann das sehr ähnliche feline Leukoplakie Virus (FPV) Hunde in der Regel nicht infizieren (Truyen u. Parrish, 1992).

Die Charaktereigenschaften der tierpathogenen Parvoviren haben auch Bedeutung für den menschlichen Patienten, wie verschiedene Arbeitsgruppen feststellten: Das humane Bocavirus kann auch bei Kindern mit gastrointestinalen Beschwerden nachgewiesen werden, sowohl bei Patienten mit als auch ohne respiratorischen Symptomen. Der Verdacht liegt nahe, dass ähnlich wie das CPV auch das humane Bocavirus neben dem respiratorischen Gewebe auch das intestinale Gewebe befallen kann. Die Ausscheidung des Virus mit dem Fäzes ist sicherlich von epidemiologischer Bedeutung (Albuquerque 2007; Vincente et al., 2007).

1. 5 Das Minute Virus of Canine (MVC)

Das Minute Virus of Canine (MVC) wird auch als canines Parvovirus Typ 1 bezeichnet (CPV 1). Da es zusammen mit dem humanen Bocavirus und dem bovinen Parvovirus (BPV) den Genus der Bocaviren bildet, soll hier kurz auf das Virus eingegangen werden.

Im Rahmen einer Studie von Atemwegserkrankungen bei Militärhunden um 1970 wurden auch Rektalproben von augenscheinlich gesunden Hunden auf Viren untersucht. Dabei wurden von Binn und Mitarbeitern elektronenmikroskopisch sichtbare Viren entdeckt, die in Hunde-Zelllinien zytopathische Effekte auslösten. Das Virus wurde wegen seiner Größe (20-21 nm), der Einzelstrang DNA und seiner Eigenschaft, in den Zellkern des Wirtes eindringen zu können, sowie seiner enormen Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen, den Parvoviren zugeordnet. Das Virus erwies sich als sehr artspezifisch, da es sich nur in Zelllinien aus Hunden künstlich anzüchten ließ.

Da es zuerst in gesunden Schäferhunden und danach auch in anderen gesunden Vertretern anderer Hunderassen gefunden wurde, wurde es als apathogen und zur natürlichen Darmbesiedelung gehörig angesehen (Binn et al., 1970).

In weiteren Studien wurde das Virus unter verschiedenen Hunderassen innerhalb der Vereinigten Staaten gefunden, aber nicht außerhalb dieser. Als Pathogen wurde es zu den Auslösern eher milder Durchfälle gezählt. Erst später wurde das Virus auch außerhalb der Vereinigten Staaten bestätigt: unter anderem 1996 in Schweden und Deutschland, 1999 in Italien und 2002 schließlich in Japan, diesmal bei neugeborenen Welpen mit Atemwegsinfektionen. In einem Fall wurde es als ursächlich für einen Abort angesehen und ein 35 Tage alter Welpe verstarb am Zusammenbruch des kardialen Systems und der Atemwege, für das ebenfalls das Virus verantwortlich gemacht wurde (Mochizuki et al., 2002). Nach diesen Studien wird eine weltweite Verbreitung angenommen und das Virus als für Welpen gefährlich eingestuft.

1. 6 Das bovine Parvovirus (BPV)

Das bovine Parvovirus (BPV) wurde 1961 entdeckt (Abinanti u. Warfield, 1961). Zunächst wurde es als hemabsorbing enteric virus (HADEN) beschrieben, aber schon bald den Parvoviren zugeordnet.

Im Tierversuch konnten bei jungen Rindern nach oraler und intravenöser Zufuhr Diarrhöen, Enteritiden und Atemwegsinfektionen beobachtet werden. In weiteren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen abgelaufenen BPV Infektionen und einer schwächeren Reproduktionsleistung der Herde beobachtet. Bei der Untersuchung des BPV als Pathogen für den Rinderfetus konnte nur in vereinzelten Fällen eine fatale, trockene Gangrän beobachtet werden. Die weltweite Verbreitung des Virus und Antikörper gegen BPV unter Rindern legt nahe, dass es sich bei BPV eher um ein harmloseres Virus handelt, das unter natürlichen Bedingungen nur in seltensten Fällen als Krankheitserreger Bedeutung hat (Sandals et al., 1995; Berns u. Parish, 2007).

1. 7 Das humane Bocavirus (hBoV)

Das humane Bocavirus (hBoV) wurde im Sommer 2005 von Tobias Allander und Mitarbeitern am Karolinska Institutet Stockholm entdeckt. Die Arbeitsgruppe entdeckte das Virus in 17 von 540 Rachenspülwasser Proben (3,1 %), die vor allem von Kindern mit akuten Atemwegsinfektionen gewonnen wurden. In 14 der 17 Proben war Bocavirus das einzig nachweisbare Pathogen (Allander et al., 2005).

Das humane Bocavirus gehört zu der Familie der Parvoviridae, Unterfamilie Parvovirinae, Genus Bocaviren. Der Genus Bocavirus wurde geschaffen, um die sich sehr ähnelnden Minute Virus of

Canine (MVC) und das bovine Parvovirus (BPV) zusammenzufassen. Aus den Silben „bo“ von bovin (lateinisch für Rind) und „ca“ von canin (lateinisch für Hund) wurde das Kunstwort Boca für das neue Genus geschaffen (McIntosh, 2006). Das Minute Virus of Canine (MVC) ist dem caninen Parvovirus sehr ähnlich. Hier ist die Taxonomie noch nicht einheitlich und von manchen Autoren wird vorgeschlagen, MVC als canines Parvovirus 1 (CPV 1) und das canine Parvovirus als canines Parvovirus 2 (CPV 2) zu bezeichnen (Carman u. Povey, 1982). Ich folge in dieser Arbeit der älteren Unterteilung in MVC und CPV.

Das von Allander *et al.* neu entdeckte Parvovirus ähnelt in seiner Nukleinsäuresequenz dem MVC und wurde deswegen als humanes Bocavirus dem Genus Bocavirus zugeordnet.

Brieu *et al.* konnten 2007 das Virus das erste mal elektronenmikroskopisch darstellen.

Ob hBoV Infektionen kausal im Zusammenhang mit Atemwegssyndromen stehen oder nur zufällige Koinfektionen sind, ist Gegenstand zahlreicher Studien. Wie bei vielen anderen neu entdeckten Viren stehen noch keine Tier- oder Zellkulturenmodell zur Überprüfung nach den Koch'schen Postulaten zur Verfügung um restlos eine Kausalität – Infektion, Erkrankung – zu klären (Fredericks u. Reiman, 1996).

Zusammenfassend haben viele Studien einen statistischen Zusammenhang herstellen können, aber manche Daten legen nahe, dass es sich bei hBoV nur um Zufallsfund ohne krankheitsverursachende Bedeutung handelt. In vielen Untersuchungen wurde eine hohe Anzahl von Koinfektionen bei einer hBoV Infektion gefunden. Dies wirft die Frage auf, ob hBoV eventuell einen Helfervirus braucht, um eine Infektion auszulösen oder selbst ein Helfervirus für andere Atemwegsviren darstellt (Schildgen et al., 2008).

Für hBoV wird eine weltweite Verbreitung angenommen. Die Länder, in denen es bis heute untersucht wurde, umfassen Schweden, Australien, USA, Japan, Südafrika, Jordanien, Frankreich, Kanada, Iran, Spanien, Niederlande, Südkorea, Thailand, Schweiz und China (Schildgen et al., 2008). Die erste deutsche Studie über hBoV stammt aus Würzburg (Weissbrich et al., 2006).

Die gefundenen Prävalenzen reichen von 1,5 % bis 19 % (Allander et al., 2007; Batién et al., 2006). Die meisten infizierten Kinder sind jünger als 24 Monate, auch wenn ältere Kinder infiziert werden können (Chung et al., 2006).

Über Saisonalität und Übertragungswege gibt es unterschiedliche Daten, die sehr unterschiedliche Schlüsse zulassen (Schildgen et. al, 2008).

1. 8 Das Respiratorische Synzytial Virus (RSV)

Auf das humane Respiratorische Synzytial Virus (RSV) muss an dieser Stelle eingegangen werden, da in der matched pairs Analyse das Kollektiv der gefundenen hBoV DNA positiven Patienten mit RSV DNA positiven Patienten verglichen werden soll.

RSV gehört zur Familie der Paramyxoviridae, Ordnung Monomegavirales, Unterfamilie Pneumovirinae, Genus Pneumovirus.

Ähnlich dem Genus Bocavirus enthält auch der Genus Pneumovirus neben RSV die vor allem tierpathogenen Formen des RS Virus (Ziegen-, Schaf- und Rinderform) und das Pneumonia Virus of Mice.

Das RS Virus ist umhüllt, besitzt eine nicht segmentierte, negativ gerichtete, Einzelstrang RNA und ist zwischen 120 und 300 nm groß. Es sind Subtypen A und B bekannt, die sich aber anscheinend in ihrer Virulenz nicht unterscheiden (Welliver, 2003).

Das Virus wurde das erste Mal 1956 in einem Labor bei Versuchsschimpanzen und Angestellten, die eine Erkältung mit Schnupfen aufwiesen, gefunden. Daher wurde das Virus zuerst mit „Chimpanzee Coryza Agent“ (Schimpanzen Schnupfen Erreger) bezeichnet (Morris et al, 1956). Auch bei erkälteten Kleinkindern wurde das Virus kurze Zeit später nachgewiesen und heute gilt das Virus als eine der häufigsten Ursachen für Atemwegsinfektionen bei Kindern weltweit (Heilman, 1990). In jüngster Zeit wurde das Virus in Hinblick auf seine Bedeutung für andere Patientengruppen, insbesondere geriatrische Patienten und Empfänger von Knochenmarkspenden, untersucht. RSV kann sehr junge Kinder und Neugeborene infizieren und ist für jährliche Epidemien verantwortlich. Es hinterlässt keine dauerhafte Immunität und Reinfektionen sind häufig. Die Hauptmanifestationen einer RSV Infektion sind Bronchitis und Pneumonie, sowie akute Exazerbation bei Asthma bronchiale und COPD Patienten. Junges Alter, Frühgeburt, chronische Herz- und Lungenkrankheiten, Immunsuppression und eine positive Familienanamnese bezüglich allergischer Erkrankungen gelten als Risikofaktoren. Das Virus wird vor allem über die Atemluft übertragen, wobei Aerosole anscheinend nicht ausreichen, sondern enger Kontakt mit der aushustenden Person erforderlich ist, sowie eine bestimmte Mindestgröße der ausgehusteten Tröpfchen. Dem nosokomialen Anteil an den RSV Infektionen kommt eine sehr hohe Bedeutung zu (Hashem u. Hall, 2003).

Tödliche Verläufe von RSV Infektionen sind eher selten. Man geht von tödlichen Verläufen in 0,3 bis 1,0 % der Fälle in westlichen Industrienationen aus und von mindestens 4500 Todesfällen jährlich in den USA (Berns u. Parish, 2007).

Klinisch manifestiert sich die Infektion meist bei einem zuvor gesunden Kind im Alter zwischen sechs Wochen und neun Monaten. Meist beginnt sie mit einer Rhinorrhö und Appetitverlust, gefolgt von einem Husten nach ein bis drei Tagen. Dazu kommen oft Niesen, Keuchen und leichtes Fieber. Die Krankheit kann in diesem Stadium sistieren und eine klinische Untersuchung ergibt Tachypnoe, rasselnde Atemgeräusche und Stenoseatmung und oft eine Otitis media mit Fieber. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Röntgenaufnahme des Thorax meist unauffällig. In milden Varianten dauert die Krankheit durchschnittlich sieben bis zwölf Tage. Bei schweren Verläufen finden sich nach Progredienz des Hustens und Keuchens oft interkostale und subkostale Einziehungen. Bei Verweigerung des Essens und unter Tachypnoe kommt es auch ohne äußere Zeichen einer Zyanose zu einer schweren Hypoxie. Radiologisch zeigt sich meist eine interstitielle Pneumonie und das Symptom der gefangenen Luft (Air Trapping). Häufig kommt es zu einer viralen und bakteriellen Superinfektion, die die Situation des Patienten verschlechtert (Berns u. Parish, 2007). Die Sterblichkeit unter Patienten mit angeborenen Herzfehlern oder chronischen Lungenerkrankungen ist mit 3,4 bzw. 3,5 % signifikant höher als bei ansonsten gesunden Patienten, wo die Sterblichkeit mit höchstens 1 % anzunehmen ist (Welliver 2003). Neben symptomatischer Behandlung steht seit 1986 in den USA Ribavirin als kausaler Therapieansatz zur Verfügung. Die Behandlung mit Ribavirin steht auf Grund von mangelnden Wirksamkeitsstudien und den hohen Kosten in der Kritik, scheint zumindest aber die Dauer des Krankenhausaufenthalts zu verkürzen (Pérez-Yarza et al., 2007; Ventre u. Randolph, 2007). Daneben finden Bronchodilatoren und Kortikosteroide Anwendung, deren Wirksamkeit ebenso umstritten ist (Berns u. Parish, 2007). Eine Impfung steht noch nicht zur Verfügung. Zur Prophylaxe von schweren RSV Infektionen bei Risikopatienten wird in Deutschland und Österreich von den Fachgesellschaften Palivizumab empfohlen (Zielen et. al., 2006).

1. 9 Fragestellungen

Diese Arbeit hat zum Ziel die Rolle des hBoV bei kindlichen Infektionen der unteren Atemwege näher zu untersuchen. Dazu wurde (1) mittels einer Standard PCR nach Boca Viren DNA in tiefgefrorenen Rachenspülwasserproben von Patienten der Universitätskinderklinik gesucht (retrospektive Studie). Um möglichst nur monoinfizierte Patienten zu erfassen wurden (2) evtl. Koinfektionen mittels Auswertung der Patientendaten bzw. wo ausstehend durch eine PCR Diagnostik auf humane Coronaviren, Respiratorisches Synzytial Viren (RSV), humane Influenzaviren A und B und humane Metapneumoviren (HMPV) DNA ausgeschlossen.

Anschließend wurden (3) die Patienten mit positivem hBoV DNA Befund in Hinblick auf wichtige klinische Parameter (wie Gewicht, Alter bei Geburt, klinischer Verlauf etc.) charakterisiert.

Die (4) hBoV DNA positiven Proben der gleichzeitig laufenden prospektiven Studie wurden ebenso charakterisiert.

Anschließend (5) erfolgte die matched pairs Analyse: Die monoinfizierten hBoV DNA positiven Patienten aus der retrospektiven und prospektiven Studie wurden einer Vergleichsgruppe von RSV DNA positiven Patienten, die sich in wichtigen Parametern wie Geschlecht, Alter bei Diagnose, Geburtsgewicht und ausgetragenen Schwangerschaftswochen, nicht signifikant unterscheiden, gegenübergestellt. Nun konnte eine Gegenüberstellung des Krankheitsverlaufs und der Krankheitsschwere erfolgen, in denen diese beiden Gruppen in Hinblick auf klinische Symptomatik, radiologischen Befund und therapeutischen Interventionen verglichen wurden.

Abschließend erfolgte (6) eine zusammenfassende Darstellung in Diskussion mit der aktuellen Datenlage.

2. Materialien und Methoden

2.1 Kits und Feinchemikalien

für die Gewinnung der DNA aus den Rachenspülwasserproben:

(1) QIAamp MinElute Virus Spin Kit

bestehend aus AL, AW2 und AVE Puffer sowie Protease und Träger (Carrier) RNA von Qiagen GmbH, Hilden.

(2) Ethanol

von KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar.

(3) Ampuva (steriles RNase-freies Aqua ad injectabilia)

von Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg.

(4) DTT

von Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science, Mannheim.

(5) RNAsin

Promega, Madison Wisconsin.

für die Durchführung der PCR:

(1) Boca Primer Boca_OS1 5'- CCCAAGAAACGTCGTCTAAC - 3'

(2) Boca Primer Boca_OS2 5'- GTGTTGACTGAATACAGTGT - 3'

von Operon Biotechnologies, Inc. Huntsville Alabama.

(3) Expand High Fidelity PCR-System Kit

bestehend aus Enzym Mix, Puffer mit 15 mM Magnesiumchlorid und Puffer ohne Magnesiumchlorid sowie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) Mix und 25 millimolare Magnesiumchlorid Lösung

von Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science, Mannheim.

(4) Boca Plasmid für die Positivkontrolle:

Klon NPSC3.1 Konzentration 80 ng/µl

von M.D. Ph.D. Tobias Allander, Karolinska Institutet, Stockholm.

(5) Natriumchlorid

von KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar.

für die Gelelektrophorese:

(1) DNA molecular weight marker VIII

pUC BM 21 DNA Hpa II + pUC BM 21 DNA Dra I + Hind III

von Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science, Mannheim.

(2) Gelladepuffer Bromphenolblau

von Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science, Mannheim.

(3) Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid)

von Merck KGoA, Darmstadt.

(4) Bioenzym LE Agarose

von Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf.

(5) TBE-Puffer

von Promega Madison, Wisconsin.

2. 2 Technische Geräte

Elektrophoresekammer	Model 41-1825 PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spannungsgerät	Consort E818 Electrophoresis Power Supply Consort nv, Turuhout Belgien
Sterile Arbeitsbank	Biowizard Kojair Techon, Vilppula Finnland
Thermoblock	Thermostat 5320 Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	Thermocycler T300 Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Vortexer	Vortex Genie 1 Touch Mixer Scientific Industries, Inc. Bohemia New York

Zentrifuge

Biofuge fresco

Heraeus Instruments, Hanau

2. 3 Rachenspülwassergewinnung

In der Universitätskinderklinik Bonn werden leitliniengerecht Patienten mit Symptomen, die auf einen viralen Infekt der Luftwege hindeuten, während der Surveillance-Periode Rachenspülwasserproben entnommen. Dazu werden ein steriler Absaugkatheter und eine Sekretfalle benutzt. Vor der Gewinnung einer Probe von ungefähr 2 bis 3 ml wird dem Patienten nasal 2 bis 3 ml sterile isotone Kochsalz-Lösung verabreicht. Die Gewinnung der Probe wird vom jeweiligen behandelnden Arzt bzw. Ärztin angeordnet. Die Proben werden durch das virologische Institut der Universität Bonn untersucht und danach bei -70 °C eingefroren.

Von allen so eingelagerten Proben wurde für diese Arbeit eine Liste erstellt, die alle Proben umfasst, die in den Herbst-, Winter- und Frühjahrsmonaten der Jahre 2002, 2003, 2004 und 2005 (in 2005 keine Proben aus Herbst- und Wintermonaten) gewonnen wurden.

Anhand dieser Liste konnten nun die entsprechenden Proben aus der Kühlung entnommen und untersucht werden.

2. 4 Gewinnung der DNA

Zur Gewinnung der DNA wurden die oben genannten Chemikalien nach Herstellerangaben verwendet (Stand: QIAamp MinElute Virus Spin Handbuch 2. Edition, April 2005). Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank des Prä-PCR-Labors durchgeführt.

Zu Beginn wurden 25 µl Protease und 5,6 µl carrier RNA in ein Sammelröhrchen gegeben. Von der aufgetauten Rachenspülwasserprobe wurden 200 µl genommen und dazu pipettiert. Wenn die Probe zu zähflüssig war, wurde sie mit bis zu 500 µl Natriumchlorid versetzt, gemischt und mit 8.000 rpm (6.000 x g) zentrifugiert, bevor 200 µl entnommen wurden. Anschließend wurde dem Gemisch 200 µl AL Puffer hinzugefügt und nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurde das Röhrchen in einen auf 56 °C vorgeheizten Thermoblock gestellt.

Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde 250 µl gekühltes Ethanol auf die Mischung gegeben und diese kurz gevortext und zentrifugiert (s.o.). Danach wurde das Gemisch für 5 min bei Raumtemperatur unter der sterilen Werkbank inkubiert.

Anschließend wurde das gesamte Volumen auf eine QIAamp MinElute Column (im Anschluß nur noch Säule genannt) gegeben.

Die Säule wurde bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert.

Das Auffanggefäß der Säule wurde verworfen und die Säule auf ein neues Auffanggefäß gesteckt. Auf die Säule wurden nun 500 µl AW2 Puffer gegeben und diese danach wiederum bei 8.000 rpm (6.000 x g) für eine Minute zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde verworfen und durch ein neues ersetzt.

Von dem Ethanol wurden nun 500 µl auf die Säule gegeben und diese anschließend abermals bei 8.000 rpm (6.000 x g) für eine Minute zentrifugiert. Danach wurde das Auffanggefäß verworfen und die Säule auf ein neues gesteckt.

Nun wurde mit 14.000 rpm (20.000 x g) für drei Minuten zentrifugiert und das Auffanggefäß verworfen.

Die Säule wurde jetzt auf ein Auffanggefäß gesteckt, in das vorher 1 µl DTT und 1 µl RNAsin gegeben wurde. Auf die Säule wurden 50 µl AVE Puffer gegeben und für drei Minuten inkubiert. Als letzter Schritt wurde nach den drei Minuten die Säule mit 14.000 rpm (20.000 x g) für eine Minute zentrifugiert. Das im Auffanggefäß durch die Zentrifugation angesammelte Material wurde sofort im nächsten Schritt - der PCR – weiterverarbeitet und danach tiefgekühlt.

2. 5 Vorbereitungen für die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Materialien und die Anleitung zur Mischung des Ezymsatzes (Mastermix) entstammen dem Expand High Fidelity PCR-System Kit der Firma Roche und wurden nach Herstellerangaben benutzt (Stand der Anleitung März 2005).

Tabelle Tab. 1 zeigt den Mischungsansatz für den Mastermix.

Für eine Probe muss man je 40 µl in einem Sammelröhrchen ansetzen.

Der Ansatz wurde kurz mit Vortexer und Zentrifuge durchmischt. Sofort danach wurden je 10 µl der DNA Aufbereitung aus dem Rachenspülwasser mit je 40 µl des Mastermixes versetzt und durch kräftiges Schütteln mit der Hand vermischt. Als Kontrollproben wurden je 40 µl Mastermix einmal mit 10 µl Ampuva (Reinheitskontrolle) und einmal mit 10 µl des Boca Plasmids (Konzentration 10^6 Plasmide/µl) versetzt (Positivkontrolle).

Ohne Zwischenkühlung wurde am selben Tag weiter verfahren.

Tabelle 1: Mischungsansatz für den Mastermix:

Für den Mastermix wurden die Reagenzien im aufgeführten Verhältnis gemischt.

Material	Menge in μ l
dNTP's	0,4
Ampuva	27,6
10% Puffer ohne $MgCl_2$	5
Boca OS_1 (20pmol)	1
Boca OS_2 (20pmol)	1
$MgCl_2$	5
Enzym	0,5

Das für die Positivkontrolle verwendete Plasmid stammt von Tobias Allander, Abteilung für klinische Mikrobiologie des Karolinska Instituts Stockholm und wurde mittels pCR[®]Blunt 3.5 kb der Firma Invitrogen Corporation Carlsbad, Kalifornien hergestellt.

Es beinhaltet ein Fragment des hBoV Isolats ST2 , welches mit den Nukleotiden 2279-2839 der Referenzsequenz DQ000496 (National Center for Biotechnology Information) übereinstimmt.

Diese entsprechen dem N Terminus des NP-1 Gens zusammen mit 131 Nukleotiden aufwärts vom Start Codon. Das Fragment hat eine Deletion einer einzelnen Base bei Nukleotid 2572. Zusammen ist das Fragment 560 Nukleotide lang.

2. 6 PCR

Zur Amplifikation der DNA Fragmente wurde eine Standard PCR verwendet (Mullis et al. 1986). Das Protokoll wurde aus der Arbeit von Tobias Allander übernommen und nur geringfügig abgewandelt, z.B. wurde die Zyklenzahl von 35 auf 40 erhöht (Allander et. al. 2005).

Es wurden insgesamt 40 Zyklen durchgeführt, die sich in folgende Einzelschritte unterteilen:

1. Denaturierung bei 99 °C für elf Minuten
2. Primerhybridierung bei 48 °C für eine Minute
3. Elongation bei 72 °C für sieben Minuten

Anschließend wurde auf 4 °C abgekühlt.

Das entstehende Produkt hatte ungefähr eine Größe von 380 bp.

2. 7 Gelelektrophorese, Einfärbung und Fotodokumentation

Das Gel wurde mit den entsprechenden Mengen Agarose und TBE-Puffer durch die biologisch technischen Assistenten hergestellt.

Die PCR Produkte wurden nach Zusatz von Bromphenolblaus, welches die Dichte der Produkte erhöht, auf das Gel aufgetragen. In die erste Lauftasche wurde der DNA Marker, in die beiden letzten Taschen wurden die Negativ- und Positivkontrollen gegeben.

Die Laufzeit betrug 55 Minuten bei 200 V, 200 mA und 100 W. Anschließend wurde das Gel für 20 Minuten in einem Becken mit Ethidiumbromid getaucht. Ethidiumbromid interkaliert als organischer Farbstoff mit der DNA. Die aromatischen Ringe des Farbstoffs interagieren mit den heteroaromatischen Ringen und Basen der Nukleinsäure. Der Farbstoff kann mittels UV Licht (254-366 nm) angeregt werden. Unter einer entsprechenden UV Lampe wurde das Gel zur Auswertung digital abfotografiert.

2. 8 Definitionen

Frühgeborene im Sinne dieser Arbeit sind Kinder mit einem Gestationsalter unter 37 Schwangerschaftswochen.

Die Hauptdiagnosen (z.B. Bronchitis, Bronchiolitis, zentrale Pneumonie, Lobärpneumonie, Lungenversagen) wurden durch den behandelnden Kinderarzt gestellt, dabei umfasst die Diagnose „Bronchiolitis“ nur Säuglinge mit Tachydyspnoe, Hypoxämie, schwerer Atemwegsobstruktion und Überblähung der Lunge ohne radiologisch nachweisbare pneumonische Infiltrate. Für die Diagnose „Pneumonie“ musste ein entsprechender radiologischer Befund von einem ausgebildeten Facharzt für Kinderradiologie vorliegen. Als „zentrale Pneumonie“ wurden perihiläre und peribronchiale Infiltrationen, als „sonstige Pneumonie“ wurden lobäre Infiltrate mit oder ohne Pleuraerguss gewertet. Atelektasen sind im Sinne dieser Arbeit keine pneumonischen Infiltrate.

Zur Einschätzung der Vitalparameter sind altersentsprechende Vergleichswerte aus der Fachliteratur herangezogen worden. Zur Diagnose „akute Otitis media“ führte nur ein entsprechender Lokalbefund, nicht aber eine Begleitotitis, die bei viralen Infekten oft zu beobachten ist.

Mittels der DSM RSV Paed[®] Datenbank kann man kombinierte Analysen durchführen. Zur Einteilung „klinischer Verdacht auf Pneumonie oder Bronchiolitis“ führt die Kombination aus reduzierter Allgemeinzustand, Tachypnoe, Hypoxämie, Obstruktion und Einziehungen.

Eine Leukozytose mit Leukozytenzahlen über $15 \times 10^9/L$, eine Linksverschiebungen (mehr als 15% Stabkernige) und Werte des C-reaktives Protein über 20 mg/L führen zur Einteilung „Verdacht auf bakterielle Superinfektion“.

Um den klinischen Schweregrad einer hBoV Infektion praktikabel erfassen zu können, greife ich auf eine durch McIntosh et al. 1993 vorgeschlagene Einteilung zurück, im Folgenden als „McIntosh-Score“ bezeichnet (McIntosh et.al., 1993). Dieser Score wurde von den Autoren ursprünglich zur Beurteilung von RSV Infektionen vorgeschlagen und umfasst folgende Schweregrade: I = mechanische Beatmung auf Grund der Infektion; II = Sauerstoff-Vorlage, aber keine mechanische Beatmung notwendig, hierunter fällt auch der Einsatz einer CPAP Beatmung (continuous positive airway pressure); III = kein Sauerstoff notwendig, nur supportive Therapie. Analog zur Routine in der DSM RSV Paed[®] Studie wurde eine Infektion mit Schweregrad IV eingestuft, wenn sie unter mechanischer Beatmung erworben wurde.

Als Normbereich für die Leukozytenzahlen wurde in dieser Arbeit der in der DSM RSV Paed[®] verwendete von 6 bis $15 \times 10^9/L$ für alle Alterstufen verwendet.

2. 9 Statistische Methoden und matched pairs Analyse

Aus der von mir durchgeführten retrospektiven Studie und aus den Daten der prospektiven Studie sollen Patienten, bei denen hBoV DNA und keine weiteren Pathogene im Rachenspülwasser nachgewiesen werden konnten, mit der entsprechenden Anzahl hBoV DNA negativen, RSV DNA positiven Patienten aus der Datenbank der DSM RSV Paed[®] Studie im Sinne einer matched pairs Analyse verglichen werden.

Bei der matched pairs Analyse handelt es sich um ein statistisches Verfahren, bei dem jedem Patienten eine weitere Kontrollperson zugeordnet wird, die in möglichst vielen Items mit dem Patienten übereinstimmt.

Als Items wurden die Daten Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung, Geburtsgewicht, Schwangerschaftswoche bei Geburt, Frühgeburtlichkeit und Vorerkrankungen ausgewählt. Für die matched pairs Analyse wurden alle Patienten eingeschlossen, die ausschließlich hBoV DNA positiv getestet wurden und für die auswertbare klinische Daten vorlagen.

Die so gefundenen Patientengruppen, die sich in diesen Items nicht signifikant unterscheiden, werden dann in ihrem Krankheitsverlauf gegenübergestellt um zu untersuchen, wie sich hBoV und RSV Infektionen unterscheiden bzw. gleichen um so schließlich die klinische Bedeutung des hBoV Virus einschätzen zu können.

Klinische und laborchemische Daten wurden aus den Patientenakten mittels eines standardisierten Erfassungsbogens extrahiert. Anschließend wurden die Daten in ein MS-Excel® Alias der DSM RSV Paed® Datenbank eingegeben. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelm Universität Bonn hat das grundlegende Protokoll der DSM RSV Paed® Studie geprüft und genehmigt.

Der grundlegende Aufbau der Studie wurde bereits publiziert (Simon et al., 2007).

Zur statistischen Auswertung wurde SPSS 11.0® (SPSS Inc., Chicago, IL) benutzt. Für kontinuierliche Variablen wurde der Student's t Test oder der Mann-Whitney U Test verwendet, für diskontinuierliche Variablen der χ^2 Test oder Fisher's Exact Test. Der Signifikanztest war zweiseitig und $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die RSV DNA positiven Patienten, die in der Datenbank geführt werden und hier benutzt wurden, sind mittels ELISA Antigen Test auf RSV DNA getestet worden [Immunchromotografie Test, Becton Dickinson Directigen®, Becton Dickinson & Comp., Sparks, Md oder Now® RSV ELISA Inverness Medical, Köln]. Zusätzlich wurde die Infektion durch Beobachtung eines zytopathischen Effekts in einer Zellkultur einer Affenzelllinie nachgewiesen (Reina et al., 2004; Simon et al, 2006).

2. 10 Diagnostik der Koinfektionen

Das mikrobiologische Institut der Universität Bonn führt routinemäßig bei allen pädiatrischen Patienten mit Verdacht auf virologischen Infekt der Atemwege Nachweistests auf folgende Viren DNA durch:

RSV und die humanen Coronaviren NL63, SARS, HKUI, OC43 und 229 E mittels PCR [Qiagen, Hilden] (Völz et al., 2007); die humanen Influenzaviren A und B mittels ELISA Antigen Test [Now® Influenza, Inverness Medical, Köln] (Heikkinen 2006) und HMPV mittels PCR [Qiagen, Hilden] (Simon et al., 2006). Die Methoden sind in den jeweiligen Publikationen genau beschrieben.

Auf diese Art wurden sowohl alle hBoV DNA positiven Patienten der beiden hier vorzustellenden Bonner Studien (retrospektive und prospektive Studie) als auch alle RSV DNA positiven Patienten, die in der matched pairs Analyse benutzt wurden, auf Koinfektionen untersucht.

3. Ergebnisse

3. 1. Ergebnisse der experimentellen Untersuchung

Wie unter Methoden beschrieben wurden die zu untersuchenden Rachenspülwasserproben anhand einer Liste ausgewählt, die sämtliche in den Frühjahr-, Herbst-, und Wintermonate der Jahre 2002, 2003, 2004 und 2005 (in 2005 nur Frühjahrsmonate) gewonnenen Proben enthielt.

Da Rachenspülwasserproben für vielfältige Untersuchungen und Forschungsarbeiten an der Universität Bonn benutzt werden, war nicht in jedem Sammelröhrchen noch genügend Sekret zur DNA Gewinnung enthalten. Insgesamt konnte aus 271 Rachenspülwasserproben DNA für diese Arbeit gewonnen werden.

Die Abbildung 1 zeigt aus welchen Monaten die untersuchten Proben stammen:

2002: Januar 27, Februar 33, März 11, November 1, Dezember 34

2003: Januar 35, Februar 10, März 2, November 4, Dezember 28

2004: Februar 7, März 25, Oktober 6, November 2, Dezember 7

2005: Januar 15, Februar 13, April 3, Mai 1, Juni 7

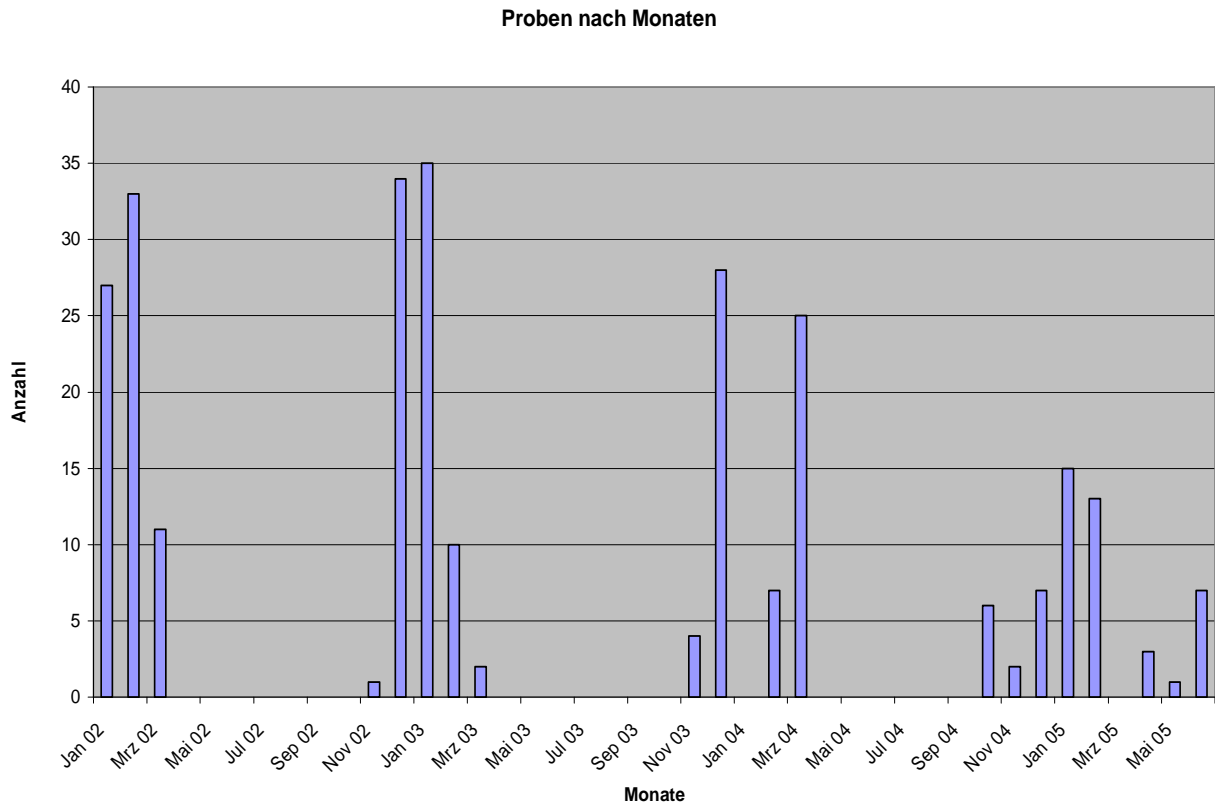


Abbildung 1: Aufschlüsselung der untersuchten Proben aus den Jahren 2002 bis 2005 nach Monaten. Anhand dieser Übersicht kann man ersehen aus welchen Monaten die untersuchten Proben stammten.

Alle diese Proben wurden wie unter Methoden beschrieben auf DNA des humanen Bocavirus untersucht. Eine Rachenspülwasserprobe wurde als positiv bewertet, wenn sich in der Gelelektrophorese in der gleichen Höhe wie bei der Positivkontrolle eine leuchtende Bande fand.

Die Abbildung 2 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer solchen Gelelektrophorese. In der ersten Tasche sieht man den leuchtenden Marker, in der letzten Tasche deutlich die Positivkontrolle. Die Negativkontrolle in der vorletzten Tasche ist deutlich nicht positiv.

In den Taschen 13 und 14 sieht man zwei leuchtende Banden. Diese beiden Proben sind damit hBoV DNA positiv.

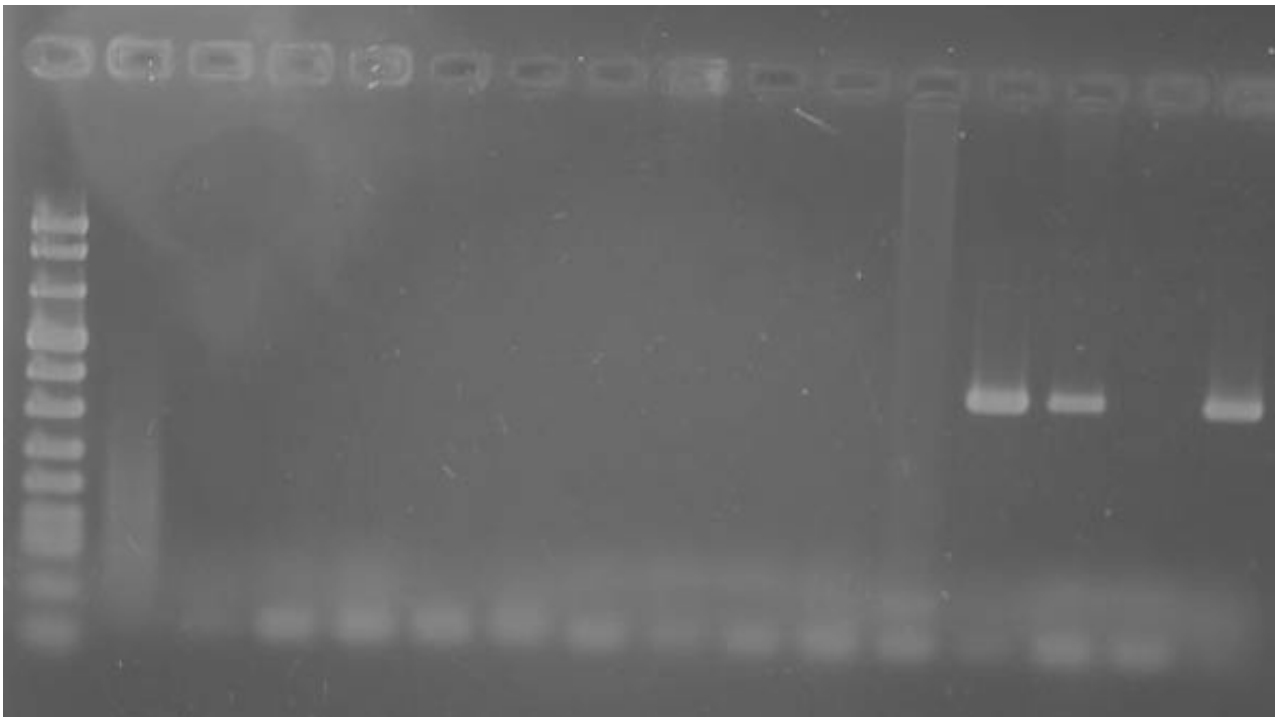


Abbildung 2: Beispielbild einer Gelelektrophoreseauswertung.

Man erkennt deutlich in der letzten Reihe die leuchtende Bande der Positivkontrolle. Auf gleicher Höhe leuchten ebenso zwei Banden. Dies spricht für das Vorhandensein von hBoV DNA in diesen beiden Proben. In der vorletzten Reihe läuft die Negativkontrolle. Da hier keine Bande auftaucht, ist diese Versuchsreihe nicht mit z.B. einer positiven Probe verunreinigt. Die entsprechenden Patienten, die zu den beiden leuchtenden Banden gehören wurden als hBoV DNA positiv für die Studie verwendet.

3. 1. 1 Häufigkeit der hBoV Infektion und Grundcharakteristik der Patienten

Von den 271 untersuchten Rachenspülwassern wurden mittels PCR 16 positiv auf Boca DNA getestet. Dies entspricht einem Anteil infizierter Patienten von 5,9 %.

Insgesamt waren vier Proben aus Januar positiv ($4/62 = 6,5 \%$), sieben aus Februar Monaten ($7/63 = 11,1 \%$), eine aus März ($1/35 = 2,9 \%$) und vier aus Dezember Monaten ($4/69 = 5,8 \%$).

Abbildung 2 zeigt die Verteilung der positiven Proben auf die jeweiligen Monate.

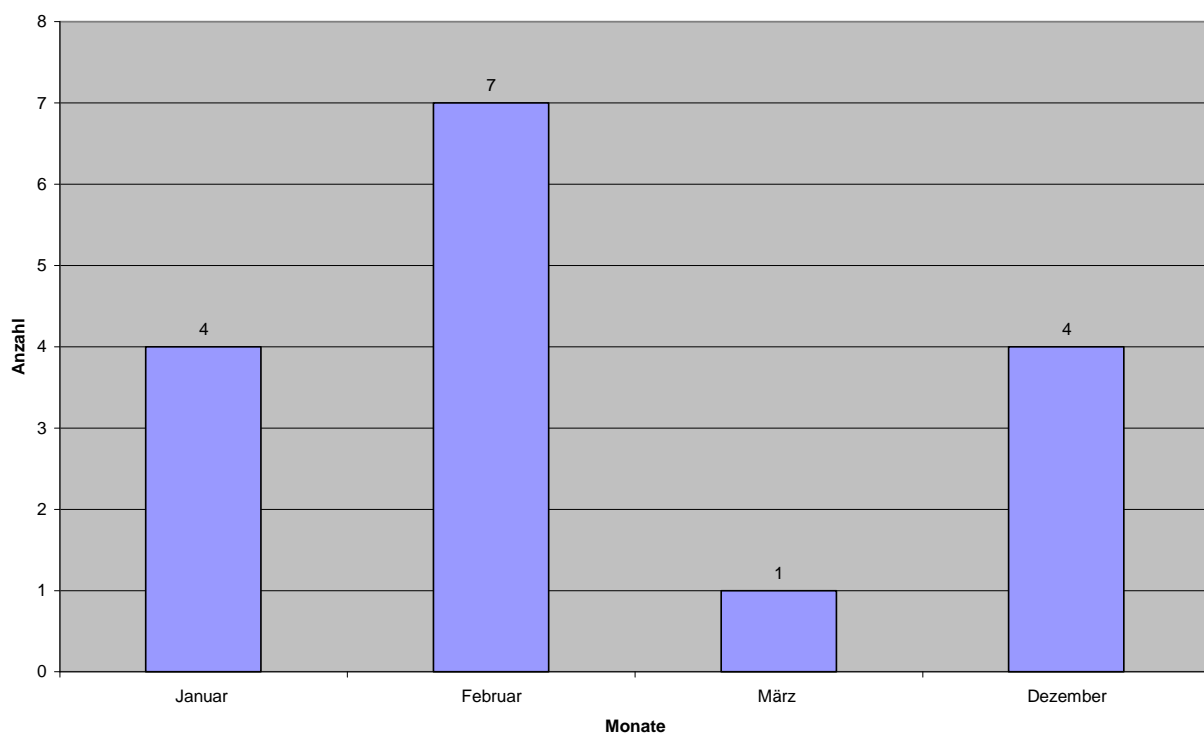


Abbildung 3: Verteilung der positiven Proben nach Monaten

Alle positiven Proben der verschiedenen Jahre verteilen sich zusammen auf insgesamt nur vier Monate: Die meisten Proben entstammen dem Februar.

Zur besseren Abschätzung der Saisonalität von Infektionen mit hBoV zeigt Abbildung 4 eine Darstellung der positiven Proben im Anteil an den aus den jeweiligen Monaten insgesamt untersuchten Proben (in %). Dazu wurden die Prozentzahlen auf ganze Werte mathematisch gerundet.

Man kann sehen, dass in den Februarmonaten der Anteil der positiv getesteten Proben zu allen in diesem Monat getesteten Proben am höchsten lag

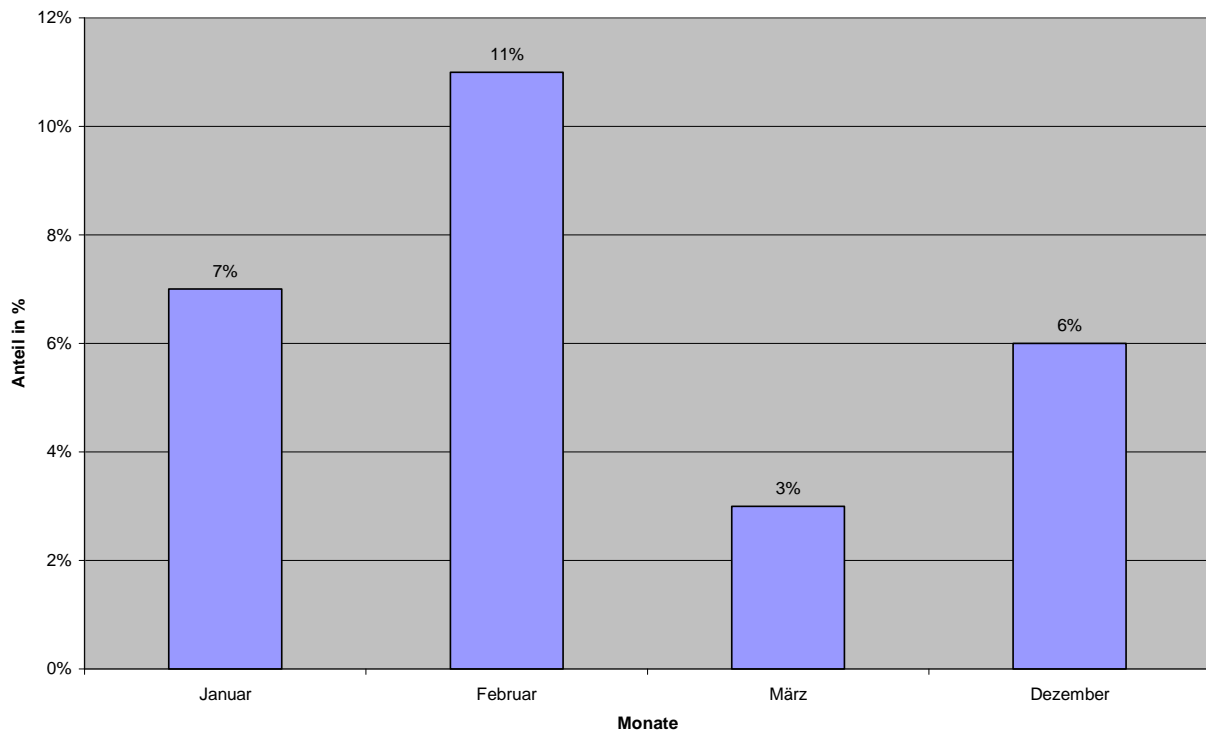


Abbildung 4: Verhältnis der positiven Proben zu allen untersuchten Proben der jeweiligen Monate: Hier sieht man die relative Verteilung der positiv auf hBoV DNA getesteten Proben. In den Februarmonaten lag der Anteil der positiven Proben zu getesteten Proben am höchsten.

Für die weitere Auswertung konnten von diesen 16 Proben vier Proben aus verschiedenen Gründen (keine oder unvollständige Patientendaten, Krankenakten usw.) nicht weiter beachtet werden. Bei der Betrachtung der Saisonalität und der Prävalenz sind die Proben aber noch berücksichtigt, so dass hier von 16, im Folgenden aber nur noch von 12 Proben ausgegangen wird.

Unter den weiter betrachteten 12 Proben befanden sich genau 6 männliche und 6 weibliche Patienten (je 50 %). Das mittlere Alter bei Diagnosestellung war 10,6 Monate (von 4,3 bis 23,4 Monate, Median 9,1 Monate). Im Durchschnitt lagen vier Tage zwischen den ersten Symptomen und der stationären Aufnahme (Mittelwert 3,8 Tage, von 0 und 10 Tage).

3. 1. 2 Symptome und Laborbefunde

Beschriebene klinische Symptome einer Infektion mit hBoV sind vor allem Husten, Rhinorrhö und Fieber bis zu 39 °C (Schenk et al., 2007). Gastrointestinale Symptome wurden bei bis zu 25 % aller hBoV infizierten Patienten beschrieben (Albuquerque et al., 2007; Arnold et al., 2006; Kesebir et al., 2006).

Es gibt keine klinischen Symptome, die allein aus klinischer Beobachtung Rückschlüsse auf eine hBoV Infektion zulassen würden oder pathognomisch für eine solche Infektion sind (Völz et al., 2007).

Bei 5 Patienten wurde eine obstruktive Bronchitis als Hauptdiagnose gestellt, bei einem Patient wurde als Hauptdiagnose Infekt der oberen Atemwege genannt, bei 6 Patienten wurde keine Hauptdiagnose gestellt.

Das mittlere Körpergewicht bei Aufnahme war 9302 g (von 3120 bis 17.500 g, Median 9520 g), wobei 4 Patienten sich dehydriert präsentierten.

Die Körpertemperatur war im Mittelwert 38 °C rektal gemessen, wobei auch gar keine Erhöhung, subfebrile und febrile Temperaturen im Bereich von 37 bis 39,9 °C (Median 37,7 °C) vorkamen. Der Allgemeinzustand wurde bei 10 Patienten von den aufnehmenden Ärzten als reduziert und bei zwei Patienten als gut eingeschätzt.

Nahezu alle Patienten bis auf einen hatten Husten, bei sieben wurde ein Giemen, bei zweien ein Stridor auskultiert. Einziehungen konnten bei 9 Patienten beobachtet werden, über Apnoen klagte ein Kind. Die mittlere Sauerstoffsättigung betrug 98 % (von 94 bis 100 %), der pCO₂ Druck war bei allen Patienten im Normbereich (von 32 bis 40 mm Hg). Die mittlere Atemfrequenz betrug 45/min (von 26-45/min).

Die Leukozytenzahl war bei zwei Patienten erhöht (23,3 x 10⁹/L und 15,7 x 10⁹/L). Die mittlere Leukozytenzahl war 12,4 x 10⁹/L (Median 12,1 x 10⁹/L).

Das CRP war bei 5 der 12 Patienten erhöht: Der CRP Mittelwert bei den Patienten mit erhöhten Werten betrug 26,4 mg/L (von 7,2 mg/L bis 62,4 mg/L).

Vier Patienten waren dehydriert, kein Patient litt an einer akuten Otitis media (AOM), die ansonsten eine typische Begleiterscheinung eines viralen Infektes ist.

Ansonsten lagen keine Symptome vor.

3. 1. 3 Radiologische Befunde

Bei neun von 12 Patienten wurde eine Röntgenaufnahme des Thorax angeordnet. Vom Kinder-radiologen wurde viermal eine Bronchitis, einmal eine zentrale und einmal eine sonstige Pneumonie diagnostiziert. Atelektasen, Lungenblähungen oder Pleuraergüsse kamen bei keinem Patienten vor

3. 1. 4 McInstosh Score, Krankheitsverlauf und Therapien

Ein Patient war beatmungspflichtig (McIntosh I) und zwei Patienten benötigten eine Sauerstoff Vorlage (McIntosh II). Alle anderen Patienten (n = 9) benötigten nur supportive Therapien und hatten somit einen milden Krankheitsverlauf (McIntosh III).

Fünf Patienten benötigten eine intravenöse Flüssigkeitssubstitution und zwei Patienten eine Sauerstoffvorlage zur Unterstützung der Atmung.

Nahezu allen Patienten (neun) wurde 3 % Natriumchlorid und Ipratropiumbromid zur Inhalation verabreicht. Je acht Patienten erhielten Betamimetika zur Inhalation und systemische Gaben von Glukokortikoiden. Sechs Patienten erhielten eine Antibiotika Therapie.

Der Patient, der im Krankheitsverlauf beatmungspflichtig wurde, hatte den insgesamt schwersten Krankheitsverlauf. Der Patient musste für 5 Tage auf die Intensivstation verlegt werden und erhielt zusätzlich zu Ipratropiumbromid, inhalative und systemische Gaben von Glukokortikoiden, inhalatives Adrenalin und Antibiotika sowie Ribaverin und Montelukast.

Keiner der Patient verstarb während hBoV Infektion. Die durchschnittliche Liegedauer der Patienten im Krankenhaus betrug 22 Tage.

3. 1. 5 Risikofaktoren und Koinfektionen in der Patientengruppe

Bei den Patienten fanden sich keine Vorerkrankungen wie angeborene Herzfehler oder ähnliches. Zwei Patienten waren nach WHO Definition Frühgeborene mit 28 bzw. 33 vollendeten Schwangerschaftswochen und unreif mit 1,060 kg bzw. 2,245 kg Geburtsgewicht. Der Patient mit dem niedrigsten Geburtsgewicht und der kürzesten Tragedauer hatte eine diagnostizierte Bronchopulmonale Dysplasie (CLD) und war deswegen bereits schon einmal stationär aufgenommen worden. Dieser Patient musste im Verlauf wie oben beschrieben intubiert und auf Intensivstation aufgenommen werden und hatte wie weiter oben bereits erwähnt den schwersten Krankheitsverlauf aller untersuchten Patienten.

Bei sechs Patienten fanden sich in den mikrobiologischen Untersuchungen Infektionen mit anderen Pathogenen (50 %). Am häufigsten war eine Koinfektion mit RSV bei fünf der sechs Patienten (83 %). Ein Patient hatte eine Influenza A Infektion.

Der Krankheitsverlauf bei den koinfizierten Patienten war nicht schwerwiegender als bei den monoinfizierten Patienten.

3. 2 Ergebnisse der prospektiven Studie

Für die sich anschließende matched pairs Analyse hBoV DNA positiver Patienten mit RSV DNA positiven Patienten wurden neben Patienten aus der vorgestellten retrospektiven Studie auch Patientendaten aus einer prospektiven Studie benutzt, die von mir und unserer Arbeitsgruppe zur gleichen Zeit durchgeführt wurde. Diese Ergebnisse werden hier analog zu den Ergebnissen der retrospektiven Studie vorgestellt.

In dieser Untersuchung wurden über eine Winterperiode von November 2005 bis Mai 2006 prospektiv alle Rachenspülwasser von an Infektionen der unteren Atemwege leidenden Kindern mittels PCR auf Bocavirus DNA getestet. Die grundlegenden Daten und Ergebnisse dieser Studie wurden bereits in einer entsprechenden Publikation veröffentlicht (Völz et al., 2007).

3. 2. 1 Häufigkeit hBoV Infektion und Grundcharakteristik der Patienten

Von den 389 Rachenspülwässern wurden 11 positiv auf hBoV getestet. Dies entspricht einer Prävalenz von 2,8 %.

Die Saisonalität, bezogen auf alle in den entsprechenden Monaten untersuchten Proben, stellte sich wie folgt dar (alle Daten mathematisch gerundet): November 2 % (n = 1), Dezember 6 % (n = 4), Januar 2 % (n = 1), Februar 0 % (n = 0), März 3 % (n = 3), April 2 % (n = 1) und Mai 3 % (n = 1).

Abbildung 5 zeigt den Anteil der positiven Getesteten Proben an den aus den entsprechen Monaten insgesamt untersuchten Proben.

In den retrospektiven Daten fand sich die höchste Prävalenz im Februar mit 11 %.

Von den 11 Patienten waren acht männlich (73 %). Das mittlere Alter bei Diagnosestellung war neun Monate (von 3 bis 17 Monate, Median 11 Monate).

Zwischen den ersten Symptomen und der stationären Aufnahme lagen im Mittelwert acht Tage (von einen bis 24 Tage).

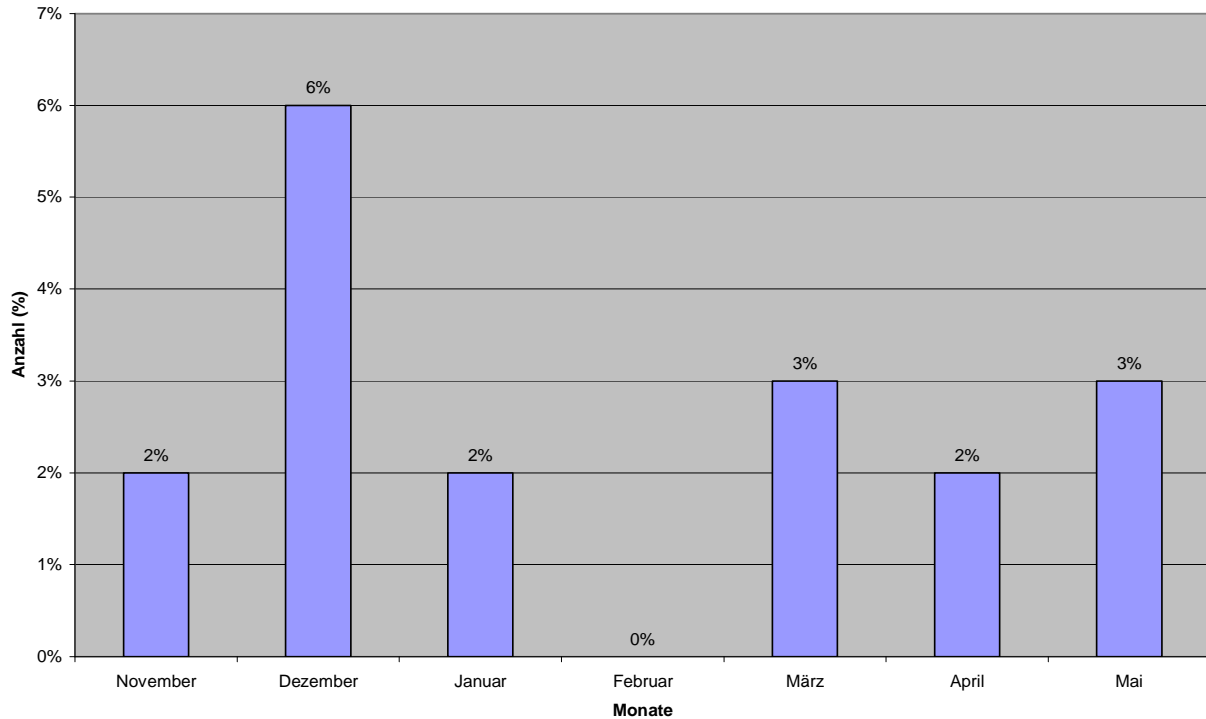


Abbildung 5: Anteil der positiven hBoV DNA Funde an den jeweiligen getesteten Proben.

Die Abbildung zeigt die relative Häufigkeit positiver hBoV DNA Funde. Der höchste Anteil liegt im Dezember, mit großem Abstand zu März und Mai. Im Februar konnte im Unterschied zur retrospektiven Studie keine hBoV DNA in den Proben nachgewiesen werden.

3. 2. 2 Symptome und Laborbefunde

Die Hauptdiagnosen waren viermal obstruktive Bronchitis, je einmal Aspiration und Krupp Syndrom und fünfmal sonstige Pneumonie.

Alle Patienten (n = 10) außer einem litten an Husten. Die gemessene Körpertemperatur betrug im Mittel 38 °C (von 37 °C bis 40 °C, Median 38 °C). Der Allgemeinzustand wurde bei zwei als gut und bei zehn als reduziert beurteilt. Bei keinem Patienten wurden Apnoen festgestellt. Bei zwei Patienten wurde Stridor und bei sieben Giemen auskultiert. Einziehungen wurden bei sieben Patienten beobachtet. Die mittlere Sauerstoffsättigung lag bei 95 %. Der niedrigste gemessene Wert war 75 %, der höchste 99 % (Median 97 %).

Bei einem Patienten war die Leukozytenzahl mit $16,7 \times 10^9/L$ erhöht. Die mittlere Leukozytenzahl lag bei $11,5 \times 10^9/L$ (Median $11,3 \times 10^9/L$). Das CRP war bei sieben Patienten erhöht mit Werten von 5,5 mg/L bis 114 mg/L (Mittelwert bei Patienten mit erhöhten CRP Werten 29 mg/L).

Bei zwei Patienten lag eine Diarrhoe vor. Bei einem der beiden Patienten konnte Norovirus DNA im Stuhl nachgewiesen werden, bei dem anderen Patient konnte kein anderer Krankheitserreger im Stuhl nachgewiesen werden, wobei auf hBoV DNA im Rahmen dieser Studie nicht untersucht wurde.

Kein Patient litt an Dehydrierung oder einer akuten Otitis media.

3. 2. 3 Radiologische Befunde

Die behandelnden Kinderärzte forderten bei zehn der elf Patienten eine Röntgenaufnahme des Thorax an (91 %). Nur bei zwei Patienten war der radiologische Befund unauffällig. Bei sechs Patienten lag eine zentrale Pneumonie vor, bei zwei Patienten eine sonstige Pneumonieform. Bei einem Patienten wurde eine Bronchitis diagnostiziert.

Bei keinem Patienten wurden Atelektasen, Lungenblähungen oder Pleuraergüsse gefunden.

3. 3. 4 McIntosh Score, Krankheitsverlauf und Therapien

Kein Patient wurde intubiert oder maschinell beatmet (McIntosh I). Bei sieben Patienten bestand akuter Sauerstoffbedarf (McIntosh II), alle anderen Patienten erhielten nur supportive Therapien, hatten also einen milden Krankheitsverlauf (McIntosh III).

Nahezu alle Patienten erhielten Ipratropiumbromid und Antibiotika (je n = 9). Sechs Patienten erhielten inhalative Adrenalin Gaben und zwei Patienten inhalative Glukokortikoidgaben. Fünf Patienten wurden mit Glukokortikoiden systemisch behandelt und ein Patient bekam Montelukast. Keiner aus dieser Gruppe bekam Ribaverin.

Ein Patient musste im Verlauf der Erkrankung für fünf Tage auf die Intensivstation verlegt werden. Kein Patient verstarb während der hBoV Infektion.

3. 3. 5 Risikofaktoren und Koinfektionen in der Patientengruppe

Unter den Patienten dieser Studie gab es keine Frühgeborenen und nur ein Patient, der bei Geburt unreif mit einem Geburtsgewicht von 0,970 kg war.

Drei Patienten (27 %) hatten neben der diagnostizierten hBoV Infektion auch noch eine andere virale Infektion. In allen Fällen war das Kopathogen RSV.

Unter den mit RSV koinfizierten Patienten war der bereits erwähnte Patient mit dem schwersten Krankheitsverlauf, der intensivmedizinische Betreuung bedurfte.

3. 3. Matched pairs Analyse

Für die matched pairs Analyse wurden nur Patienten benutzt, bei denen im Rachenspülwasser kein anderes Pathogen bzw. DNA gefunden wurde und für die auswertbare Patientendaten zur Verfügung standen. Insgesamt entsprachen diesen Ansprüchen 14 Patienten. Sechs Patienten entstammen der retrospektiven Studie, acht Patienten der prospektiven Studie.

Diesen insgesamt 14 Patienten wurden im Sinne einer matched pairs Analyse 14 RSV positive Patienten aus der DSM RSV Paed[®] Datenbank zugeteilt. Wie unter Methoden bereits erläutert wurde ein P-Wert < 0,005 als signifikant angesehen. Die statistische Auswertung gab keinen Anlass, die Annahme, dass sich die beiden zu vergleichenden Gruppen nicht signifikant unterscheiden, zu verwerfen. Daher konnte wie Tabelle 2 zeigt jeden hBoV+ Patienten erfolgreich ein RSV+ Patient zugeordnet werden.

Tab. 2: Basisdaten der 14 hBoV positiven Patienten verglichen mit den 14 gematchten RSV positiven Patienten. In den zu untersuchenden Basisdaten unterscheiden sich beide Patientenkollektive in keinem Punkt signifikant, so dass eine matched pairs Analyse durchgeführt werden kann.

Item	hBoV+	RSV+	P-Werte
Geschlecht männlich	n=7 (50%)	n=8 (51%)	0,705
Alter bei Diagnose in Tagen Median (Range)	366 (132-645)	318 (75-772)	0,662
Schwangerschaftswochen Median (Range)	39 (30-42)	39 (28-41)	0,886
Geburtsgewicht in Gramm Median (Range)	3750 (976-4640)	3650 (1096-4030)	0,065
Frühegeborenes (< 37 SSW)	n=1 (7%)	n=1 (7%)	1
Geburtsgewicht in Gramm < 1.500	n=1 (7%)	n=1 (7%)	1

Bezüglich Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Geburtsalter und Geburtsgewicht unterschieden sich die beiden Patientenruppen nicht signifikant. Dem Frügeborenen unter den hBoV positiven Patienten konnte ein RSV positives Frühgeborenes zugeordnet werden. Keiner der für die matched pairs Analyse verwendeten Patienten litt unter CLD, Asthma, angeborenen Herzfehlern oder anderen angeborenen Vorerkrankungen.

3. 3. 1 Symptome und Diagnosen

Bei nahezu allen Patienten war der Allgemeinzustand (AZ) bei Aufnahme reduziert: 79 % (hBoV+) bzw. 86 % (RSV+).

Husten kam in 93 % (hBoV+) bzw. in 86 % (RSV+) der Fälle vor und war somit das häufigste Symptom. Auch Obstruktionen und Einziehungen wurden oft beobachtet: Obstruktionen in 71 % (hBoV+) bzw. 50 % (RSV+) und Einziehungen in 64 % (hBoV+) bzw. 57% (RSV+).

Insgesamt präsentieren sich beide Patientengruppen mit ähnlicher Symptomatik und es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Nur bei der gemessenen Körpertemperatur liegt ein signifikanter Unterschied vor: Die Temperatur hBoV infizierter Patienten liegt mit durchschnittlich 38,3 °C unterhalb der Temperatur von mit RSV infizierten Patienten mit durchschnittlich 39 °C.

Die Laborbefunde (Leukozytenzahlen) unterscheiden sich in beiden Gruppen nicht signifikant.

In beiden Gruppen gab es keine Fälle von Arrhythmien oder Krampfanfälle.

Tabelle 3 zeigt die klinische Symptomatik der beiden Patientenkollektive (hBoV+ und RSV+) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Von den hBoV+ Patienten wurden in 86 % der Fälle eine Röntgenaufnahme des Thorax (CXR) durchgeführt. Bei den RSV+ Patienten war dies nur in 57 % der Fälle der Fall.

In Tabelle 4 sind die durch den jeweiligen Kinder-Radiologen gestellten Diagnosen aufgelistet.

In ca. der Hälfte der Fälle wurde je eine Pneumonie diagnostiziert: bei den hBoV+ Patienten in 41 % und bei den RSV+ Patienten in 57 % der Fälle. Am meisten wurde die Diagnose einer zentralen Pneumonie gestellt (hBoV+ 29 %, RSV+ 36 %).

Tab. 3: Klinische Symptomatik bei Diagnosestellung

Nur bei der Körpertemperatur gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. In allen anderen klinischen Symptomen gleichen sich die beiden Gruppen, was auf ähnlich schwere Krankheitsverläufe hindeuten kann.

Befund	hBoV+	RSV+	p-Wert
Reduzierter AZ	n = 11 79 %	n = 12 85 %	1
Guter AZ	n = 3 21 %	n = 2 14 %	1
Fieber (> 38,5°C)	n = 5 36 %	n = 9 64 %	1
Husten	n = 12 93 %	n = 12 86 %	1
Apnoen	n = 11 7 %	n = 1 7 %	1
Einziehungen	n = 9 64 %	n = 8 57 %	0.699
Stridor	n = 2 14 %	n = 2 14 %	1
Obstruktionen	n = 10 71%	n = 7 50 %	0,246
Akute Otitis Media	n = 0 0	n = 3 21 %	0,222
Temperatur in °C Median (Range)	38,3 (37,0-39,2)	39 (37,3-40,5)	0,024
Leukozyten in x10⁹/L Median (Range)	11,45 (8,4-23,2)	11,10 (4,6-18,4)	1

Tab. 4: Röntgenbefunde

Die Tabelle zeigt die Anzahl der durchgeführten Röntgenuntersuchungen und die von Kinderradiologen gestellte Diagnosen und stellt sie gegenüber. Die Röntgenbefunde beider Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant.

Befund	hBoV+	RSV+	p-Wert
CXR gemacht	n = 12 86 %	n = 8 57 %	0,209
Pneumonie	n = 6 41 %	n = 7 50 %	1
Zentrale Pneumonie	n = 4 29 %	n = 5 36 %	1
Andere Pneumonie	n = 2 14 %	n = 2 14 %	1

3. 3. 2 Therapeutische Interventionen

In Tabelle 5 sind die unterschiedlichen Therapien aufgelistet. Nahezu alle Patienten erhielten eine Antibiotikagabe (hBoV+ 71 %, RSV+ 64 %). Ansonsten kamen vor allem inhalative Gaben von Adrenalin, Betamimetika und Steroide, sowie systemische Steroidgaben und intravenöse Volumensubstitution zum Einsatz.

Einer der dringsten und häufigsten therapeutischen Interventionen bei Atemwegsinfektionen jeglicher Art stellt die Sicherstellung der Sauerstoffverfügbarkeit da. Mittels McIntosh Score kann man eine Abstufung dieser Intervention vornehmen und so auch Rückschlüsse auf die Ersthaftigkeit der Erkrankung schließen.

Tab 5: Therapien

Die wichtigsten der üblichen ärztlichen Interventionen bei einem solchen Krankheitsbild sind in dieser Übersicht zusammen und gegenüber gestellt. Beide Gruppen erhielten nahezu die gleichen Therapien, nur bei der systemischen Gabe von Steroiden gibt es einen signifikanten Unterschied, mehr hBoV+ Patienten erhielten eine solche.

Therapie	hBoV+	RSV+	p-Wert
Antibiotikagabe	n = 10 71 %	n = 9 64 %	1
Inhalatives Adrenalin	n = 5 36 %	n = 1 7 %	0,168
Inhalative Steroide	n = 5 36 %	n = 3 21 %	0,678
Inhalative Betamimetika	n = 6 43 %	n = 10 71 %	0,127
Systemische Gabe von Steroiden	n = 6 43 %	n = 0 0	0,016
Sauerstoffgabe	n = 6 43 %	n = 6 43 %	1
Intravenöse Volumentherapie	n = 4 29 %	n = 8 57 %	0,127

Je sechs hBoV+ Patienten und RSV+ Patienten erhielten eine supportive Sauerstoffgabe und werden somit dem McIntosh Score II zugeordnet. Da kein Patient maschinell beatmet werden musste und kein Patient unter maschineller Beatmung die Infektion erwarb, wurden alle anderen Patienten dem McIntosh Score III zugeordnet. Tabelle 5 zeigt die Einteilung nach McIntosh Score im Überblick.

Tab 6: McIntosh Score

Der modifizierte McIntoshs Score beschreibt den Schweregrad der Infektion in vier Graden.

Grad 1 Intubation und mechanische Beatmung aufgrund der Infektion

Grad II Zusätzliche Gabe von Sauerstoff

Grad III rein symptomatische Therapie ohne zusätzliche Sauerstoffgabe

Grad IV Patient ist zum Zeitpunkt der Infektion aus anderen Gründen bereits intubiert und beatmet (auch bei Patienten mit Tracheostoma)

Die Patienten beider Gruppen verteilen sich gleichmäßig auf die Schweregrade II und III.

McIntosh-Score	hBoV+	RSV+	p-Wert
I	0	0	/
II	n = 6 43 %	n = 6 43 %	1
III	n = 8 57 %	n = 8 57 %	1
IV	0	0	/

4. Diskussion

4.1 hBoV: Ursache für Atemwegsinfektionen oder nur ein Zufallsfund?

Die hier präsentierte matched pairs Analyse vergleicht erstmals hBoV DNA positive Patienten ohne nachgewiesene Koinfektionen mit RSV DNA positiven Patienten ohne nachgewiesene Koinfektionen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine hBoV Infektion anscheinend nicht milder als eine RSV Infektion verläuft.

Die RSV Infektion im Kindesalter ist eine ernstzunehmende Erkrankung, die Letalität liegt bei ansonsten gesunden Kindern bei bis zu 1 % (Berns u. Parish, 2007). Wahrscheinlich kommt auch hBoV eine pathogenetische Bedeutung zu. Der Nachweis von hBoV DNA in Rachenspülwasser erkrankter Kinder ist allerdings kein Beweis dafür, dass hBoV der Auslöser der klinischen Symptomatik ist. Es gibt zahlreiche Viren, die vorübergehend in den Atemwegssekreten nachweisbar sind ohne eine Krankheit zu verursachen. Daher muss die Bedeutung jedes neu entdeckten Virus als Auslöser von Infektionszeichen kritisch beurteilt werden (Fredericks et al., 1996).

Ähnlich wie für andere kürzlich entdeckte Viren steht für hBoV noch kein Zellkulturmodell zur Verfügung, anhand dessen man einen zytopathischen Effekt mit einer hBoV Infektion in Verbindung bringen könnte.

Das Bocavirus ist nicht mit anderen bekannten humanpathogenen respiratorischen Viren verwandt, so dass auch auf diesem Weg keine krankheitsverursachende Rolle von hBoV abgeleitet werden kann.

Andere humane Parvoviren (z.B. B19 und PARV4) können, wie in der Einleitung schon beschrieben, monate- bis jahrelang im menschlichen Organismus persistieren. Sollte dies auch für das Bocavirus gelten, kann ein positiver hBoV DNA Fund auch nur einen Nachweis persistierender Viren ohne Zusammenhang mit der aktuell zu beobachtenden klinischen Symptomatik darstellen (Manning et al., 2007).

Daher sind vergleichende Studien, die sowohl bei symptomatischen als auch bei asymptomatischen Patienten bzw. Probanden nach hBoV suchen, besonders wichtig.

Die jüngste Studie, die sich mit dieser Frage beschäftigt, ist die Studie von Frey et al. aus 2007. Diese thailändische Studie, koordiniert vom amerikanischen Center of Disease Control and Prevention, hat Rachenspülwasser von 1168 Patienten mit ambulant erworbenen Pneumonien, von 512 Patienten mit grippeähnlichen Symptomen (WHO Definition: Influenza-like Illness) und von 280 asymptomatischen Personen auf hBoV untersucht.

Nur bei drei der asymptomatischen Patienten (1 %) wurde hBoV DNA gefunden. Bei den Patienten mit Pneumonien und grippeähnlichen Symptomen lag der Anteil positiver hBoV DNA Nachweise mit 3,9 % (n = 20) bzw. 4,5 % (n = 53) signifikant höher. In der Altersgruppe der Kinder bis vier Jahre, die in dieser Arbeit vorrangig betrachtet wurden, lag der Anteil hBoV DNA positiver Patienten mit Pneumonie bei 12 und unter den asymptomatischen Patienten nur bei 2 %. Diese Arbeitsgruppe hat auch die Viruslast der hBoV DNA positiven Probanden untersucht und festgestellt, dass eine hohe Viruslast nahezu ausschließlich bei symptomatischen Patienten vorlag (Lu et al., 2006).

Auch andere Studien haben asymptomatische Kontrollgruppen in ihre Untersuchungen mit einbezogen. Die Arbeitsgruppe Kesebir *et al.* konnte bei keinen von 96 untersuchten asymptomatischen Kindern hBoV DNA nachweisen; hingegen waren bei 425 symptomatischen Kindern in 5,2 % hBoV DNA nachweisbar (Kesebir et al., 2006) Allander *et al.* fand bei keinen von 64 Patienten ohne Symptome hBoV DNA im Rachenspülwasser, im Gegensatz zu 49 hBoV DNA Nachweisen bei 259 symptomatischen Patienten (Allander et al., 2007).

Letztendlich erfordern die Koch'schen Postulate, die Verfügbarkeit eines Tiermodells. Die erwähnten Studien untermauern aber eindrucklich den dringenden Verdacht, dass hBoV zumindest im Kindesalter ein Auslöser respiratorischer Infektionen ist.

4. 2 Prävalenz

In der eigenen retrospektiven Studie fand sich für den Nachweis von hBoV DNA in NPA Proben eine Prävalenz von 5,9 %, in der prospektiven Studie lag die Prävalenz bei 2,8 %. Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt des hBoV DNA Nachweises war mit 10,6 Monaten in der retrospektiven und 9 Monaten in der prospektiven Untersuchung ähnlich.

In der Literatur findet man für den Nachweis von hBoV DNA in NPA Proben Prävalenzen von 1,5 % bis 19 % (Allander et. al., 2007; Bastien et al., 2007). Die meisten der untersuchten symptomatischen Kinder waren jünger als 24 Monate (Allander et al., 2007; Chung et al., 2006; Qu et al., 2007; Sloots et al., 2006).

Beide Bonner Studien bewegen sich also im Mittelfeld der publizierten Prävalenzzahlen und bestätigen die Annahme, dass sich vor allem jüngere Kinder unter 24 Monaten symptomatische hBoV Infektionen zuziehen.

Aussagekräftige Untersuchungen zu älteren Kindern liegen bislang nicht vor.

Es gibt nur wenige Studien, die das Vorkommen von hBoV DNA in respiratorischen Sekreten von Erwachsenen untersucht haben (Bastien et al., 2007; Manning et al., 2006).

Eine japanische Studie hat Daten zur Seroepidemiologie publiziert. Die Arbeitsgruppe Endo und Mitarbeiter hat von 204 Personen im Alter zwischen wenigen Tagen und 41 Jahren Serumproben untersucht und bei 71 % (n = 145) gegen hBoV gerichtete Antikörper nachweisen können. Ab einem Alter von 6 Jahren waren nahezu alle Patienten seropositiv (94-100 %), bei Kindern zwischen sechs und acht Lebensmonaten lag der Anteil der seropositiven nur bei 5,6 %. Diese Daten lassen darauf schließen, dass hBoV weit verbreitet ist, dass die Erstinfektion im späten Säuglingsalter bzw. im Kleinkindalter stattfindet und anschließend eine humorale Immunantwort nachweisbar ist. Ob diese Antikörper eine Immunität gegen Reinfektionen vermitteln, ist ungeklärt. Antikörpernachweise im Serum von Säuglingen vor dem 6. Lebensmonat (Anti-hBoV-IgG) sind wahrscheinlich diaplazentaren Ursprungs (Endo et al., 2007). Auch hier ist unklar, ob diese ‚Leihantikörper‘ von der Mutter das Neugeborene bzw. den Säugling vor einer hBoV Infektion der tiefen Atemwege schützen.

4. 3 Saisonalität

Die beiden hier präsentierten Studien lassen aus methodischen Gründen keine validen Rückschlüsse auf die Saisonalität von hBoV Infektionen zu.

Auch bereits publizierte Daten lassen keine eindeutige Bestimmung einer Saisonalität zu. Studien aus Ländern mit ähnlichen klimatischen Bedingungen wie in Deutschland beschreiben eine höhere Infektionsrate in den Winter- und Frühlingsmonaten (Allander et al., 2005). Beschrieben ist unter anderem aber auch eine Saisonalität von Spätfrühling bis Frühsommer (Choi et al., 2006). Wie bei anderen viralen Erregern von Atemwegsinfektionen scheint es zudem auch bei hBoV Unterschiede in der Prävalenz von Jahr zu Jahr zu geben (Maggi et al., 2007).

Wie die meisten retrospektiven Studien, wurden auch in der eigenen parallel zur Hauptsaison für stationär behandelte Atemwegsinfektionen im Kindesalter vorwiegend Proben aus den Herbst-, Winter- und Frühlingsmonaten getestet. Perineale Untersuchungen aus deutschen Patientenkollektiven gibt es bisher nicht. Um eine genauere Untersuchung der Saisonalität zu betreiben, müsste man Proben aus allen Monaten in ausreichenden, vergleichbaren Mengen von symptomatischen und asymptomatischen Patienten untersuchen.

4. 4 Klinische Symptomatik

Nach den Ergebnissen der matched pairs Analyse unterscheidet sich die klinische Symptomatik bei Patienten mit hBoV Infektion anscheinend nicht signifikant von den klinischen Manifestationen der RSV Infektion. Zumindest in dem hier untersuchten sehr umschriebenen Patientenkollektiv verlief die hBoV Infektion nicht milder aber auch nicht schwerwiegender als die RSV Infektion.

Die Mehrheit der Patienten in beiden Gruppen zeigte einen reduzierten Allgemeinzustand am Tag der Diagnosestellung. Die Hauptsymptome waren Husten, Obstruktionen, Einziehungen, Stridor und Atempausen, ohne dass diese Symptome in einer der beiden Gruppen signifikant häufiger auftraten.

RSV infizierte Patienten hatten bei Diagnosestellung signifikant höhere mediane Temperaturen: 39 °C vs. 38,3 °C bei den hBoV positiven Patienten.

Fieber ist bei der Beurteilung des einzelnen Patienten als klinisches Unterscheidungsmerkmal zwischen bakteriellen und viralen Atemwegsinfektionen nicht geeignet, auch wenn bakterielle Infektionen im Mittel häufiger Fieber über 39 °C verursachen (Thoracic Society, 2002).

Die häufigsten berichteten Symptome einer hBoV Infektion sind Husten, Rhinorrhö und Fieber (Schenk et al., 2007). Die hier publizierten Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen.

In der retrospektiven Untersuchung fanden sich unter den klinischen Krankheitsbildern vor allem Pneumonien (n = 6), obstruktive Bronchitis (n = 5) und einmal eine Infektion der oberen Luftwege.

Obstruktive Bronchitis wurde in der prospektiven Studie mehrmals durch den behandelnden Kinderarzt als Hauptdiagnose angegeben (n = 4). Die häufigste Diagnose in dieser Gruppe war jedoch ebenfalls die Pneumonie (n = 5). Je einmal wurde die Diagnose Aspiration bzw. Krupp-Syndrom (subglottische Laryngitis) gestellt.

Damit bewegen sich die Bonner Ergebnisse im Spektrum der für hBoV Infektionen publizierten Hauptdiagnosen. Diese sind Bronchitis, Bronchiolitis, Pneumonie und akute Exazerbation eines Asthma bronchiale.

Keiner der Patienten in der eigenen Untersuchung litt unter einem vorbestehenden Asthma bronchiale, das ohnehin meist erst bei älteren Patienten diagnostiziert wird.

Die Symptome akuter Infekte der Atemwege ähneln sich sehr stark. So sind auch ähnliche Hauptdiagnosen für RSV und HMPV Infektionen beschrieben (Wilkesmann et al., 2006;

Williams 2005). Es gibt keine Symptome oder klinischen Krankheitsbilder, die pathognomisch für eine hBoV Infektion sind (Allander et al., 2005; Kleines et al., 2007).

Bei bis zu 25 % der hBoV positiven Patienten fanden sich zusätzlich gastrointestinale Symptome (Albuquerque et al., 2007; Arnold et al., 2006; Kesebir et al., 2006). Wie in der virologischen Einleitung beschrieben, sind die mit hBoV verwandten bovinen und caninen Bocaviren bekannte Auslöser gastrointestinaler Infektionen bei Tieren.

In der Literatur ist ein sechs Monate alter Junge beschrieben, der wegen Bronchopneumonie und Diarrhö untersucht wurde. Die Proben sowohl vom Rachenspülwasser, als auch vom Stuhl waren positiv für hBoV. Die Stuhlprobe wurde anschließend negativ auf Rota-, Astro-, Andeo- und Calicivirus 1 und 2 getestet (Maggi et al., 2007). Die Tenazität des Parvovirus hBoV kann bedingen, dass sich bei Patienten mit hoher Viruslast in den Atemwegen auch Viren im Stuhl finden.

Anhand der bislang publizierten Daten läßt sich ein Zusammenhang zwischen gastrointestinalen Symptomen und dem Nachweis von hBoV DNA in Stuhlproben nicht klären. Während Lee et al. nur bei 0,8 % von 942 Kindern mit gastrointestinalen Beschwerden hBoV im Stuhl nachweisen konnten (Lee et al., 2007), berichten Neske und Mitarbeiter einen hohen Zusammenhang zwischen hBoV+ Rachenspülwassern und positiven Stuhlproben: von 31 in NPA hBoV DNA positiver Probanden standen ebenso Stuhlproben zur Verfügung, davon waren 14 Proben positiv (45,2 %) auf hBoV DNA (Neske et al., 2007).

Die Asservierung von Stuhlproben gehört nicht zum Standard der Diagnostik von akuten Atemwegsinfektionen; daher wurde auch in der hier beschriebenen prospektiven Studie auf die Untersuchung von Stuhlproben auf hBoV DNA verzichtet.

4. 5 Radiologische Befunde

Aufgrund der wenig spezifischen klinischen Symptomatik kann die Diagnose einer Pneumonie meist nur mit Hilfe eines Röntgenbildes gesichert werden. Allerdings lässt das Röntgenbild bei Kindern mit Pneumonie meist keine sichere Unterscheidung zwischen viralen und bakteriellen Infektionen zu (Donnely, 2001; Hardey u. Boynes 2003).

Es entspricht der allgemeinen Praxis, nur bei stationär behandelten Patienten ein Röntgenbild anzufertigen (British Thoracic Society, 2002).

Virale Infektionen betreffen vor allem das respiratorische Epithel und führen zu Entzündungen mit Ödemen der bronchialen und bronchiolären Wandstrukturen (Aherne et al., 1970). Bei einer zentralen (Broncho-)pneumonie kommen perihiläre Infiltrate hinzu.

Diese Pathologie stellt sich im Röntgenbild durch zunehmende peribronchiale Verdichtungen, die von den Hila in die Lunge einstrahlen, dar. Säuglinge mit Bronchiolitis zeigen neben überblähten Lungenabschnitten typischerweise auch Atelektasen (kollabierte Lungenabschnitte). Dies liegt an den anatomischen Verhältnissen bei Kleinkindern: kollaterale Wege, die durch Nekrosematerial verstopfte Abschnitte belüften könnten, wie die kohnschen Poren und der Lambert-Gang sind kaum oder noch gar nicht ausgeprägt (Donnelly, 2001).

Die Mehrzahl der Bronchiolitis-Fälle ohne ein pneumonisches Infiltrat im Röntgenbild werden durch Viren verursacht; eine Lobärpneumonie häufiger durch bakterielle Krankheitserreger (z.B. Pneumokokken) (Gotway et al., 2005).

Pneumothoraces, Pleuraergüsse, Pneumatozelen und Lungenabszesse kommen selten bei viral verursachten Infekten vor und waren früher radiologische Kriterien um zwischen den beiden verschiedenen Ursachen abzugrenzen (Osborne, 1978).

Dies konnte aber durch neuere Daten nicht untermauert werden (Thoracic Society, 2002). Pädiater und pädiatrische Radiologen tendieren dazu, bei stationär behandelten Patienten mit radiologisch gesicherter Pneumonie ohne Erregernachweis, eine bakterielle Pneumonie zu diagnostizieren (Donnelly, 2001).

In beiden untersuchten Patientengruppen wurde in der Mehrzahl der Fälle durch den behandelnden Kinderarzt eine Röntgenaufnahme des Thorax angeordnet (9/12 bzw. 10/11 der Fälle). Oft wurde durch den Kinderradiologen eine Diagnose gestellt. In der retrospektiven Studie Bronchitis (n = 4) und Pneumonie (n = 2) und in der prospektiven Studie ebenfalls Bronchitis (n = 1) und Pneumonie (n = 8)

In der matched pairs Analyse zeigten sich in Bezug auf die Ergebnisse der radiologischen Diagnostik keine signifikanten Unterschiede.

Allenfalls mittels einer Computertomographie, die in diesem klinischen Kontext nur äußerst selten durchgeführt wird, lassen sich gelegentlich die virale Genese unterscheiden, im Röntgenbild ist dies nicht möglich (Gotway et al., 2005).

In den untersuchten Kollektiven lag der Anteil pathologischer Röntgenbefunde zwischen 80 % (prospektive Studie) und 55 % (retrospektive Studie). In der Literatur findet man hierzu Angaben zwischen 43 % und 83 % (Allander et al., 2005; Foulongne et al., 2006).

Der hohe Anteil der Patienten mit mindestens einem Röntgenbild unterstreicht den klinischen Schweregrad der Erkrankung (75% bzw. 91% der Fälle).

Wahrscheinlich wird auch die Entscheidung für oder gegen eine empirische antibakterielle Therapie wesentlich vom Ergebnis der radiologischen Diagnostik bestimmt.

4. 6 Akute Obstruktion und Asthma bronchiale

Eine akute Bronchialobstruktion mit expiratorischem Giemen war in beiden hBoV+ Gruppen eines der Hauptsymptome der hBoV Infektion. In der matched pairs Kohorte zeigten 71 % der hBoV+ Patienten diese klinische Manifestation.

Mehrere publizierte Studien legen nahe, dass die akute Bronchialobstruktion (,Engl.: ,wheezing') neben Husten, Einziehungen und Fieber, ein Hauptsymptom einer hBoV Infektion ist (Allander et al., 2005; Fry et al., 2007). Chung und Mitarbeiter fanden bei 13,8 % von 231 Kindern mit 'wheezing' hBoV DNA in Rachenspülwasserproben. In 5,6 % war hBoV das einzige nachweisbare Pathogen. Nur RSV DNA wurde genauso häufig nachgewiesen wie hBoV DNA (Chung et. al., 2007).

Akute Exazerbationen, verursacht durch Virusinfektionen, sind bei Asthmatikern und COPD Patienten von erheblicher Bedeutung für die Morbidität (Malia et al., 2007; Wedchiza 2004).

In den meisten Publikationen wird eine hBoV Infektion mit akuten Exazerbationen von Asthma bei älteren Kindern in Verbindung gebracht, und zwar mit einer Häufigkeit von bis zu 27 % (Allander et al., 2005; Foulongne et al., 2006). In der Studie von Maggi et al. konnte allerdings bei keinem von 22 untersuchten erwachsenen Asthma-Patienten mit akuter Exazerbation hBoV nachgewiesen werden (Maggi et al., 2007).

4. 7 Laborbefunde

Die Leukozytenzahlen der Patienten der retrospektiven Gruppe lagen durchschnittlich bei $12,4 \times 10^9/L$. In der prospektiven Gruppe lagen sie durchschnittlich bei $11,5 \times 10^9/L$.

Nur bei wenigen Patienten waren die Leukozytenzahlen erhöht: bei einem Patienten aus der retrospektiven Gruppe ($23,3 \times 10^9/L$) und bei einem Patient der prospektiven Gruppe (mit $16,7 \times 10^9/L$).

Vergleicht man die Leukozytenzahlen der hBoV+ Patienten mit denen der RSV+ Patienten, so gibt es keine signifikanten Unterschiede. Bei fünf Patienten der 12 aus der retrospektiven Studie war der Wert des C reaktiven Proteins (CRP) im Mittel auf 26,4 mg/L erhöht.

Mehr Patienten aus der prospektiven Studie hatten erhöhte CRP Werte und zwar sieben der 11 Patienten (Mittelwert 29 mg/L).

Ähnliche Werte wurden für bereits für hBoV Infektionen publiziert (Ma et al., 2006).

In der Studie von Allander et al. wurden etwas geringere Leukozytenzahlen bei 12 hBoV Patienten veröffentlicht ($9,1 \times 10^9/L$; Range $6,3-16,3 \times 10^9/L$). Auch der Wert für das CRP lag etwas geringer (Allander et al., 2007).

Es gibt zurzeit noch keine Studien, die andere laborchemische Entzündungszeichen wie Interleukine oder Prokalzitonin im Kontext einer hBoV Infektion untersucht haben.

Es gibt keine Laborbefundkonstellation, die den behandelnden Kinderarzt unmittelbar an eine hBoV Infektion denken lassen könnte oder die gar ermöglicht, eine hBoV Infektion von einer anderen viral bedingten Infektion der unteren Atemwege zu unterscheiden.

Generell ist es schwierig anhand von Laborparametern, einschließlich dem CRP Wert, virale von bakteriellen Atemwegsinfektionen sicher abzugrenzen (Clark et al., 2007). Auch andere Marker der so genannten Akuten Phase wie Zellsenkungsgeschwindigkeit und Zählung der Leukozyten und Neutrophilen, zeigen keine signifikanten Unterschiede bei unterschiedlichen Krankheitsursachen, weswegen man diese Marker nicht zwingend bei jedem Patienten bestimmen muss (British Thoracic Society, 2002). Wie auch in anderen klinischen Situationen sind diese Marker eher zur Verlaufsüberwachung geeignet: Sekundär deutlich ansteigende CRP Werte lassen an die Möglichkeit einer bakteriellen Superinfektion denken.

4. 8 Koinfektionen

Bei sechs der 12 Patienten in der retrospektiven Studie konnte ein weiteres Virus im Rachenspülwasser nachgewiesen werden (50 %). Die Koinfektionsrate war in der prospektiven Kohorte mit 36 % niedriger. Das am häufigsten nachgewiesene Kopathogen war RSV. Nur in einem Fall wurde mit Influenza A ein anderes kopathogenes Virus nachgewiesen.

Wie unter Materialien und Methoden beschrieben, haben wir nicht nach Adeno-, Parainfluenza- oder Rhinoviren gesucht die vor allem bei Kleinkindern als Kopathogene infrage kommen.

In den bis heute publizierten Studien ist durchweg eine hohe Koinfektionsrate zwischen 18 und 90 % (Schildgen et al., 2008) beschrieben. Am häufigsten wurden RSV, HMPV, Adeno- und Rhinoviren als Kopathogene nachgewiesen.

Die hohe Rate an Koinfektionen macht die Bewertung der krankheitsverursachenden Rolle von hBoV schwierig. Wie in der Einleitung beschrieben gibt es unter den Parvovirinae den Genus Dependovirus, deren Vertreter einen Helfervirus zur Infektionsauslösung benötigen (Berns u. Parish, 2007). Ob Bocaviren auch auf ein solches Helfervirus angewiesen sind oder selber als Helfervirus für andere Viren fungieren (z.B. für RSV) ist ungeklärt.

Genauso fraglich ist, ob vielleicht persistierende Bocaviren bei einer Virusinfektion mit einem anderen Virus ihren „Ruhestatus“ verlassen und daher im Blut gefunden werden können, während sie hingegen bei monoinfizierten Patienten intrazellulär verbleiben und sich dadurch einer Diagnostik erfolgreich entziehen.

Es ist nicht bekannt, ob Koinfektionen den Verlauf einer hBoV Infektion erschweren oder evtl. hBoV als Kopathogen die klinischen Manifestationen anderer Virusinfektionen aggraviert.

4.9 Therapeutische Intervention

Die matched pairs Analyse zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen der RSV-positiven und der RSV-negativen (hBoV positiven) Kohorte in Bezug auf die therapeutischen Interventionen. Neben Sauerstoffvorlage (bei pulsoxymetrisch gemessener Sauerstoffsättigung unter 94%) und Ausgleich der oft vorliegenden Dehydratation bekommen die RSV+ und hBoV+ Patienten Inhalationen mit Adrenalin, Steroiden und Betamimetika. Nur bei der systemischen Gabe von Steroiden unterscheiden sich die beiden Patientengruppen: 43 % hBoV+ Patienten in der matched pairs Analyse bekamen eine solche Gabe, während kein RSV+ Patient systemisch Steroide verabreicht bekam.

In beiden Gruppen wurden in den meisten Fällen Antibiotika verabreicht (hBoV+ 71 %, RSV+ 64 %). Während man bei einer isolierten Betrachtung der hBoV Studien noch zu dem Ergebnis kommen kann, dass evtl. die Ärzte bei negativem RSV Ergebnis den Verdacht auf eine bakterielle Pneumonie hatten und daher Antibiotika verabreichten (Völz et.al. 2007), zeigt sich aber

auch bei den RSV-positiven Patienten mit radiologisch gesicherter Pneumonie ein hoher Anteil mit Antibiotikatherapie. Hier besteht ein Potential zur Einsparung von Antibiotika, die

insbesondere bei leichteren Formen einer RSV-positiven Pneumonie, ohne Hinweis auf eine bakterielle Superinfektion, nicht indiziert sind

Es gibt bis heute keinen Goldstandard um sicher zwischen viral und bakteriell bedingten Infektionen der Atemwege zu unterscheiden (Churgay, 1996).

Die Therapie viraler Infektionen bei immunkompetenten Kindern ist in der Regel rein symptomatisch mit Volumenersatztherapie, der Überwachung der Sauerstoffsättigung und deren Sicherstellung mittels Sauerstoffvorlagen oder maschineller Beatmung.

Studien unter erwachsenen pulmologischen Patienten zeigen, dass die Steroidgaben, ob systemisch oder inhalativ, kontrovers betrachtet werden müssen. Anscheinend verbessern z.B. die Gaben inhalativer Steroide nicht die Gesamtprognose von COPD Patienten, bisher eine klassische Indikation für inhalative Steroide. Im Gegenteil erhöhen diese Gaben sogar das Risiko für Hospitalisation und andere Komplikationen (Ernst et al., 2007). Des Weiteren haben zahlreiche Studien gezeigt, dass die Gaben von Steroiden bei viral verursachten Bronchitiden keine Wirkung haben (Fitzgerald u. Kilham 2004). Auch die Therapie mit Bronchodilatoren ist bei viralen Bronchitiden nicht angezeigt: Sie verbessern nicht die Atemfrequenz oder die Sauerstoffsättigung der Patienten und führen auch nicht zu kürzeren stationären Aufenthalten (Ogra et al., 2004).

Ein Schnelltest auf hBoV wäre wünschenswert um die nicht gerechtfertigten Gaben von Antibiotika, Steroiden und Betamimetika bei Kindern mit hBoV-Infektionen zu vermeiden. Diese Bedeutung wurde auch schon in Hinblick auf RSV Infektionen untersucht (Adcock et al., 1997).

Sollte sich die Rolle des Bocavirus als ernstes krankheitsverursachendes Pathogen in weiteren Studien bestätigen, wird wohl der Versuch unternommen werden, analog den Bemühungen für RSV und HMPV einen Impfstoff zu entwickeln (Schmidt, 2007).

In der Prävention von RSV Infektionen gibt es seit längerem zwei vielversprechende Ansätze. Zum einen gibt es den Versuch mit dem monoklonalen Antikörper Palvizumab schwere RSV Infektion bei Hochrisikokindern im Neugeborenen und Säuglingsalter zu verhindern bzw. einzudämmen (Pedraz et al, 2003, Romero, 2003).

Eine weiterer therapeutischer Ansatz zur Therapie lebensbedrohlicher RSV Infektionen bei immunsupprimierten Kindern ist die Verabreichung von Ribavirin (Ohmit et al., 1996). Außerhalb dieser sehr umschriebenen Patientensubpopulation ist Ribavirin noch nicht indiziert, da der Nutzen unbewiesen ist. Möglicherweise hat die Therapie mit Ribavirin bei einer RSV

Infektion günstige Effekte auf die spätere mögliche Entwicklung eines allergischen Asthma bronchiale und der Entwicklung einer generellen Atopie (Chen et al., 2008).

Auch wenn Ribavirin von manchen Autoren als „Breitbandvirostatikum“ angesehen wird, schließt das ungünstige Nebenwirkungsprofil, die potentielle Teratogenität, die schwierige Verabreichung (mehrere Stunden täglich als Inhalation) und die hohen Kosten, einen breiteren Einsatz von Ribavirin bei RSV-Infektionen noch aus.

4. 10 Schlussfolgerung

Die hier vorgelegten Untersuchungen haben gezeigt, dass hBoV bei stationär behandelten Kindern nachgewiesen werden kann. Ob es sich um ein relevantes Pathogen handelt oder lediglich um einen ‚innocent bystander‘ ist nach wie vor ungewiss.

Die matched pairs Analyse zeigte bei den Patienten mit Atemwegsinfektion und Nachweis von hBoV DNA im respiratorischen Sekret keine signifikanten Unterschiede zu einer vergleichenden Kohorte von Kindern mit RSV Infektion. Dies kann als ein Hinweis zur Pathogenität von hBoV verstanden werden.

Die Therapie beider Kohorten zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, wobei der hohe Anteil antibiotisch behandelter Patienten kritisch hinterfragt werden sollte.

Mit der Entdeckung von hBoV ist ein weiteres Virus in die inzwischen umfangreiche Liste der erwiesenen oder wahrscheinlichen Auslöser von Atemwegsinfektionen aufgenommen worden. Viele Infektionen der unteren Atemwege, die nach einem negativen RSV Nachweis bisher als bakteriell verursacht angesehen wurden und mit Antibiotika behandelt wurden, könnten durch hBoV oder weitere, noch nicht entdeckte respiratorische Viren verursacht sein.

Vor allem bei stationär behandelten Patienten sollte, wenn die entsprechende Diagnostik verfügbar ist, nach viralen Erregern von Atemwegsinfektionen gesucht werden.

Zum einen kann so die unkritische Anwendung von Antibiotika reduziert werden. Zum anderen ist es nur so möglich, die Bedeutung dieser Erreger in einem klinischen Kontext zu beurteilen.

4. 11 Ausblick

Letztlich können nur diagnostische Methoden, die aus kleinen Proben mittels RNA oder DNA-Amplifikation den hochsensitiven Nachweis spezieller Erreger zulassen, das inzwischen sehr breite Spektrum möglicher Erreger von Atemwegsinfektionen im Kindesalter mit ausreichender

Sensitivität darstellen. Longitudinale Untersuchungen im Verlauf müssen klären, wie lange die neuen Viren in respiratorischen Sekreten nachweisbar bleiben. Die matched pairs Analyse von Patienten, die ausschließlich mit einem Virus infiziert sind (bei denen lediglich ein Virus nachgewiesen wurde) kann - ebenso wie die Untersuchung von gesunden asymptomatischen Kindern - ein wichtiges Instrument zur Beurteilung der Pathogenität eines neuen Virus darstellen.

Studien mit Zellkultursystemen und Tiermodellen und verbesserte Methoden der serologischen Diagnostik werden in Zukunft wesentlich zur Beantwortung der zahlreichen noch offenen Fragestellungen in Bezug auf das humane Bocavirus beitragen.

Am Anfang dieser Arbeit stand die Entscheidung, auf welche potentiellen Krankheitserreger man die Rachenspülwasserproben untersuchen sollte. Aus praktischen Gründen habe ich mich, wie unter „Materialien und Methoden“ beschrieben auf die häufigsten virologischen Krankheitserreger in der zu untersuchenden Altersgruppe beschränkt (z.B. HMPV, Influenza A und B).

Dabei wurden die Proben weder in Hinblick auf bakterielle Krankheitserreger noch auf Pilze untersucht. Viele, insbesondere erst kürzlich entdeckte „emerging“ Viren, konnten nicht berücksichtigt werden, weil dies den Umfang dieser Arbeit gesprengt hätte. Anschließende Studien, sollten die in dieser Arbeit als hBoV+ diagnostizierten Proben auf ein erweitertes Spektrum an Krankheitserregern untersuchen, insbesondere auf Rhino- und Echoviren.

Proben, die sich nach einer solchen eingehenden mikrobiologischen Diagnostik als allein für hBoV DNA positiv herausstellen, müssten dann in einer erneuten matched pairs Analyse untersucht werden. Fraglich ist, ob eine solche Analyse durchgeführt werden kann, denn viele hospitalisierte Kinder zeigen Infektionen mehrerer Erreger die ambulant und nosokomial erworben wurden und oft werden virale Pneumonien von bakteriellen Superinfektionen begleitet. Ziel sämtlicher Anstrengung muss am Ende die Etablierung eines Zell- oder Tiermodells sein, um endgültige nach den Koch'schen Postulaten hBoV sicher als pathogen oder nicht klassifizieren zu können.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Das humane Bocavirus ist ein 2005 erstmals beschriebenes Virus, das seitdem weltweit in Zusammenhang mit Atemwegssyndromen bei hospitalisierten Kindern beobachtet wird. Während über die Prävalenzzahlen dieser Infektion zahlreiche Publikationen veröffentlicht sind, fehlen noch Daten zur klinischen Bedeutung des Bocavirus. Diese Arbeit versucht anhand der Gegenüberstellung von hBoV positiven Patienten mit RSV positiven Patienten die klinische Bedeutung des Virus besser einzuschätzen.

Methode: Mittels einer Standard-PCR wurden 271 Rachenspülwasserproben aus den Frühjahrs-, Herbst- und Wintermonaten der Jahre 2002 bis 2005 retrospektiv auf hBoV untersucht und prospektiv 389 Proben aus der Winterperiode von November 2005 bis Mai 2006.

Aus den positiven Funden wurden die Patienten ausgesucht, die keine Koinfektionen hatten und für die auswertbare Patientendaten vorlagen. Diesen monoinfizierten Patienten wurden in einer Matched Pair Analyse in den Basisdaten nicht signifikant unterscheidbare RSV infizierte Patienten zugeordnet. Im weiteren Vorgehen wurden Verlauf, Symptomatik, Schweregrad, radiologische Befunde und Therapie der hBoV und der RSV Infektionen gegenübergestellt und verglichen.

Ergebnis: In der retrospektiven Studie konnten 16 Proben positiv auf hBoV getestet werden (5,9 %) und in der prospektiven Studie 11 (2,8 %). Von diesen Patienten waren insgesamt 14 Patienten alleine hBoV positiv und konnten erfolgreich mit 14 RSV positiven Patienten gematcht werden. Eine Gegenüberstellung zeigte, dass außer in den Werten für die Körpertemperatur sich die Symptome beider Patientengruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Auch in der Auswertung in Bezug auf Schweregradeinschätzung, Therapie und Bildgebung der Infektionen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Schlussfolgerung: Eine hBoV Infektion verläuft nicht milder aber auch nicht schwerwiegender als eine RSV Infektion. Da die RSV Infektion eine schwerwiegende und bedeutsame pädiatrische Erkrankung darstellt, muss man auch die klinische Bedeutung des humanen Bocavirus für pädiatrische Patienten als ernstzunehmend einstufen. Eine mikrobiologische Abklärung bei ambulant erworbenen Infekten der unteren Atemwege im Kindesalter sollte immer neben RSV auch auf hBoV als wichtiges, respiratorisches Virus untersucht werden.

6. Schlussbemerkungen

6.1 Kenntlichmachung nicht eigener Leistungen

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von PD Dr. Oliver Schildgen am Virologischen Institut der Universität Bonn. Sämtliche hier dargestellten Experimente der retrospektiven Studie wurden von mir selbst durchgeführt. Experimentelle Arbeiten der prospektiven Studie, deren Daten auch für die matched pairs Analyse benutzt wurden, wurden teils von mir, teils von Frau Ramona Liza Tillmann oder anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe ausgeführt.

Die statistische Auswertung geschah unter Anleitung von Frau Dr. Anja von Renesse, Kinderklinik DRK Kliniken Westend, Berlin.

6.2 Publierte Arbeiten

Aspekte dieser Arbeit waren bereits Gegenstand von zwei Publikationen:

- Schildgen O, Klinkenberg D, Tillmann RL, Renesse von A, Müller A, Simon A. Human Bocavirus Infection cause similar symptoms and clinical severity as Respiratory Syncytial Virus infections. *(zur Publikation eingereicht)*
- Völz S, Schildgen O, Klinkenberg D, Ditt V, Müller A, Tillmann RL, Kupfer B, Bodo U, Lentze MJ, Simon A. Prospective study of Human Bocavirus (HboV) infection in a pediatric university hospital in Germany 2005/2006. *J Clin Virol*; 2007 40: 229-235

6.3 Limitation der Studien

Wie alle wissenschaftlichen Arbeiten unterliegt auch diese mehreren Limitationen.

Bei den hier vorgestellten Studien handelt es sich um zwei monozentrische Studien. Die Daten lassen sich evtl. nicht auf andere Kliniken übertragen.

Wie bei allen medizinischen Tests, können falsch positive Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In der retrospektiven Studie konnten nicht alle in Frage kommenden tiefgefrorenen Rachenspülwasserproben untersucht werden, da manche Patientenproben schon für andere Forschungsarbeiten aufgebraucht worden waren.

Für die prospektive Studie gilt, dass möglicherweise nicht alle Patienten mit Symptomen einer Infektion der oberen Atemwege die in der untersuchten Wintersaison in der Unikinderklinik Bonn vorstellig wurden, erfasst worden sind.

Diese Arbeit stellt keine Interventionsstudie dar, über die Wirksamkeit einzelner Therapien kann daher keine Aussage gemacht werden, sämtliche Aussagen darüber und Empfehlungen über Therapien und bildgebene Verfahren sind nur eine Zusammenfassung der aktuellen Literatur diesbezüglich.

6. 4 Rechtliche Hinweise

Diese Arbeit wurde finanziell durch die Else-Kröner-Fresenius-Stiftung (Bad Homburg) unterstützt (Nr. A01/05//F00). Die DSM RSV Paed[®] Studie wird unterstützt von der Abbott GmbH (Wiesbaden). Die Arbeitsgruppe erhält Förderungen der Europäischen Kommission (LSHM-CT-2006-037276).

Ansonsten bestand und besteht keine finanzielle oder sonstige Verbindung zu einer der Firmen deren Produkte verwendet oder im Text erwähnt worden sind.

Alle Prozeduren und das grundlegende Protokoll der DSM RSV Paed[®] Studie wurden durch die Ethikkommission des Universitätsklinikum Bonn genehmigt und entsprechen den Standards, wie sie in der Helsinki Deklaration von 1975 bzw. in der revidierten Fassung von 2000 niedergelegt sind.

Evtl. fehlende Hinweise auf einen Kopierschutz, insbesondere im Abschnitt „Materialien und Methoden“, bedeuten nicht, dass es sich im Einzelfall nicht doch um patentgeschützte Produkte oder durch internationales Recht geschützte Eigennamen handelt.

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1 Aufschlüsselung der untersuchten Proben nach Monaten	29
Abb. 2 Beispielbild einer Gelelektrophoreseauswertung	30
Abb. 3 Verteilung der positiven Proben nach Monaten	31
Abb. 4 Verhältnis der positiven Proben zu allen untersuchten Proben	32
Abb. 5 Anteil der positiven Proben an den untersuchten Proben	36

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1 Mischungsansatz für den PCR Mastermix	24
Tab. 2 Basisdaten der 14 hBoV+ und 14 RSV+ Patienten	38
Tab. 3 Klinische Symptomatik bei Diagnosestellung	40
Tab. 4 Röntgenbefunde	41
Tab. 5 Therapien	42
Tab. 6 McIntosh Score	43

7. Literaturverzeichnis

Abinanti FR, Warfield MS. Recovery of a hemadsorbing virus (HADEN) from gastrointestinal tract of calves. *Virology* 1961; 14: 288-289

Adcock PM, Stout GG, Hauck MA, Marshall GS. Effect of rapid viral diagnosis on the management of children hospitalized with lower respiratory tract infection.

Pediatr Infect Dis J 1997; 16: 842-846

Aherne W, Bird T, Court SDM, Gardner PS, McQuillin J. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol* 1970; 23: 7-18

Albuquerque MC, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhão AG, Ramirez ML, Erdman D, Santos N. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil.

Emerg Infect Dis 2007; 13: 1756-1758

Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol* 2007; 41: 29-33

Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HGM, Lehtinen P, Österback R, Vuorinen T, Waris M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, van den Hoogen BG, Hyypiä T, Russkanen O. Human Bocavirus and Acute Wheezing in Children. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 904-909

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples.

Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 12891-12896

Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent Detection of Human Rhinoviruses, Paramyxoviruses, Coronaviruses, and Bocavirus During Acute Respiratory Tract Infections. *J Med Virol* 2006; 78: 1232-1240

Arnold JC, Singh KK, Spector SA. Human Bocavirus: Prevalence and Clinical Spectrum at a Children's Hospital. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 283-288

Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus Infection Canada.

Emerg Infect Dis 2006; 12: 848-850

Bastien N, Chui N, Robinson JL, Lee BE, Dust K, Hart L, Li Y. Detection of Human Bocavirus in Canadian Children in a 1-Year Study. J Clin Microbiol 2007; 45: 610-613

Berns K, Parish CR. Parvoviridae. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, eds. Fields Virology Volume II. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2436-2477

Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, Kajima M. Recovery and Characterization of a Minute Virus of Canines. Infect Immun 1970; 1: 503-508

Brieu N, Gay B, Segondy M, Foulongne V. Electron Microscopy Observation of Human Bocavirus (HboV) in Nasopharyngeal Samples from HboV-Infected Children.

J Clin Microbiol 2007; 45: 3419-3420

British Thoracic Society of Standard Care Committee. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in childhood. Thorax 2002; 57: 1-24

Carman S, Povey C. Successful Experimental Challenge of Dogs with Canin Parvovirus-2.

Can J Comp Med 1982; 46: 33-38

Chen CH, Lin YT, Yang YH, Wang LC, Lee JH, Kao CL, Chiang BL. Ribavirin for respiratory syncytial virus bronchiolitis reduced the risk of asthma and allergen sensitization.

Pediatr Allergy Immunol 2008; 19: 166-172

Choi EH, Lee HJ, Kim SY, Eun BW, Kim NH, Lee JA, Lee JH, Song EK, Park SHKJY, Sung Y.

The Association of Newly Identified Respiratory Viruses with Lower Respiratory Tract Infections in Korean Children, 2000-2005. Clin Infect Dis 2006; 43: 585-582

Chung JY, Han TH, Kim CK, Kim SW. Bocavirus Infection in Hospitalized Children, South Korea. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1254-1256

Chung JY, Han TH, Kim SW, Hwang ES. Detection of viruses indentified recently in children with acute wheezing. *J Med Virol* 2007; 79: 1238-1243

Churgay CA. The diagnosis and management of bacterial pneumonias in infants and children. *Prim Care* 1996; 23: 821-835

Clark JE, Hammal D, Spencer D, Hampton F. Children with pneumonia : how do they present and how are they managed? *Arch Dis Child* 2007; 92: 394-398

Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975; 1: 72-73

Donnelly LF. Practical issues concerning imaging of pulmonary infection in children. *J Thorac Imaging* 2001; 16: 238-250

Drosten C, Günther S, Preiser W, Werf S van der, Brodt HR, Becker S, Rabenau H et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1967-1976

Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T. Seroepidemiology of Human Bocavirus in Hokkaido Prefecture, Japan. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3218-3223

Eis-Hübinger AM, Dieck D, Schild R, Hansmann M, Schneweis KE. Parvovirus B19 Infection in pregnancy. *Intervirology* 1998; 41: 178-184

Ernst P, Gonzales AV, Brassard P, Suissa S. Inhaled Corticosteroid Use in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and the Risk of Hospitalization for Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 162-166

Fitzgerald DA, Kilham HA. Bronchiolitis: assessment and evidence-based management. *Med J Aust* 2004; 180: 399-404

Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodière M, Segondy M. Human Bocavirus in French Children. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1251-1253

Fredericks DN, Reiman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 18-33

Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, Anderson LJ, Erdman D, Olsen SJ. Human Bocavirus: A Novel Parvovirus Epidemiologically Associated with Pneumonia Requiring Hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007; 195: 1028-1045

Freyer JF, Delwart E, Hecht FM, Bernardin F, Jones MS, Shah N, Baylis SA. Frequent detection of the parvoviruses PARV4 and PARV5 in plasma from blood donors and symptomatic individuals. *Transfusion* 2007; 47: 1054-1061

Fryer JF, Kapoor A, Minor PD, Delwart E, Baylis SA. Novel parvovirus and related variant in human plasma. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 151-154

Gagnon A, Povey R. A possible parvovirus associated with an epidemic gastroenteritis of dogs in Canada. *Vet Rec* 1979; 104: 263-264

Gern JE. Viral respiratory infection and the link to asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 78-86

Gotway MB, Berger WG, Leung JWT. Pulmonary Infections. In Webb WR, Hrsg. *Thoracic imaging: pulmonary and cardiovascular radiology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005: 356-396

Hardey M, Boynes S. *Paediatric Radiography*. Oxford: Blackwell Science, 2003: 37-38

Hashem M, Hall CB. Respiratory syncytial virus in healthy adults: the cost of a cold. *J Clin Virol* 2003; 27: 14-21

Heikkinen T. Influenza in children. *Acta Paediatr* 2006; 95: 778-784

Johnston SL. Overview of virus-induced airway disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 150-156

Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol* 2005; 79: 8230-8236

Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Human Bocavirus Infection in Young Children in the United States: Molecular Epidemiological Profile and Clinical Characteristics of a Newly Emerging Respiratory Virus. *J Infect Dis* 2006; 194: 1276-1282

Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Häusler M. High Prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract diseases using a standard PCR protocol and a novel real time PCR protocol. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1032-1034

Klig JE, Chen L. Lower respiratory infections in children. *Curr Opin Pediatr* 2003; 15: 121-126

Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. Detection of Human Bocavirus in Children Hospitalized because of Acute Gastroenteritis. *J Infect Dis* 2007; 196: 994-997

Lederman M, Bates RC, Stout ER. In Vitro and In Vivo Studies of Bovine Parvovirus Proteins. *J Virol* 1983; 48: 10-17

Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, Erdman DD. Real-Time PCR Assay for Detection of Bocavirus in Human Specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3231-3235

Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T, Kikuta H. Detection of Human Bocavirus in Japanese Children with Lower Respiratory Tract Infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1132-1134

Maggi FE, Andreoli E, Pifferi M, Meschi S, Rocchi J, Bendinelli M. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. *J Clin Virol* 2007; 38: 321-325

Mallia P, Contoli M, Caramori G, Pandit A, Johnston SL, Papi A. Exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): focus on virus induced exacerbations. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 73-97

Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallmam N, Templeton K, Simmonds P. Epidemiological Profile and Clinical Associations of Human Bocavirus and Other Human Parvoviruses. *J Infect Dis* 2006; 194: 1283-1290

Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. Comparison of Tissue Distribution, Persistence, and Molecular Epidemiology of Parvovirus B19 and Novel Human Parvoviruses PARV4 and Human Bocavirus. *J Infect Dis* 2007; 195: 1345-1352

McConnochie KM, Hall CB, Barker WH. Lower respiratory tract illness in the first two years of life: epidemiologic patterns and costs in a suburban pediatric practice. *Am J Public Health* 1988; 78: 34-39

McIntosh ED, De Silva LM, Oates RK. Clinical severity of respiratory syncytial virus group A and B infection in Sydney, Australia. *Paediatr Infect Dis J* 1993; 12: 815-819

McIntosh K. Human Bocavirus: Developing Evidence for Pathogenicity. *J Infect Dis* 2006; 194: 1197-1198

Mochizuki M, Hashimoto M, Hajima T, Takiguchi M, Hashimoto A, Une Y, Roerink F, Ohshima T, Parrish CR, Carmichael LE. Virologic and serologic identification of minute virus of canines (canine parvovirus type 1) from dogs in Japan. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3993-3998

Morris J, Blount R, Savage R. Recovery of cythopathogenic agent from chimpanzee with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92: 544-549

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quart* 1986; 51: 263-273

Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW, Weissbrich B. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infection and phylogenetic analysis.

J Clin Microbiol 2007; 45: 16-22

Ohmit SE, Moler FW, Monto AS, Khan AS. Ribavirin utilization and clinical effectiveness in children hospitalized with respiratory syncytial virus infection.

J Clin Epidemiol 1996; 49: 963-967

Ogra P. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Pediatr Respir Rev* 2004; 5: 119-126

Osborne D. Radiologic Appearance of Viral Disease of the Lower Respiratory Tract in Infants and Children. *Am J Roentgenol* 1978; 130: 29-33

Pedraz C, Carbanell-Estrary X, Figueras-Alay J, Quero J. Effect of palvizumab prophylaxis in decreasing respiratory syncytial virus hospitalizations in premature infants.

Pediatr Infect Dis J 2003; 22: 823-827

Pérez-Yarza E, Moreno A, Lázaro P, Mejias A, Ramilo O. The association between respiratory syncytial virus infection and the development of childhood asthma: a systematic review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26: 733-739

Qu X, Duan Z, Qi Z, Xie Z, Gao H, Liu W, Huang C, Peng F, Zheng L, Hou Y. Human Bocavirus Infection, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 165-168

Reina J, Gonzales Gardenas M, Ruiz de Gopegui E, Padilla E, Ballesteros F, Mari M, Munar M. Prospective evaluation of a dot-blot enzyme Immunoassay (Directgen RSV) for the antigenic detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates of paediatric patients.

Clin Microbiol Infect 2004; 10: 967-971

Romero JR. Palvizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus disease from 1998 to 2002: results from four years of palvizumab usage. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 46-54

Sandals WCD, Povey RC, Meek AH. Prevalence of Bovine Parvovirus Infection in Ontario Dairy Cattle. *Can J Vet Res* 1995; 59: 81-86

Schmidt AC. Progress in Respiratory Virus Vaccine Development. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28: 243-252

Simon A, Ammann RA, Wilkesmann A, Eis-Hübinger AM, Schildgen O, Weimann E, Peltner H, Seiffert P, Süß-Graffeo A, Groothuis JR, Liese J, Pallacks R, Müller A. the DSM RSV Ped Study Group. Respiratory syncytial virus infection in 406 hospitalized and five premature infants: results from prospective German multicentre database. *European J Pediatr* 2007; 166: 1273-1283

Simon A, Khurana K, Wilkesmann A, Müller A, Engelhart S, Exner M, Schildgen O, Eis-Hübinger AM, Groothuis JR, Bode U. Nosocomial respiratory syncytial virus infection: Impact of prospective surveillance and targeted infection control. *Int J Hyg Environ Health* 2006; 209: 317-324

Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol* 2006; 35: 99-102

Swingler GH. Radiologic differentiation between bacterial and viral lower respiratory infection in children: a systematic literature review. *Clin Pediatr (Phila)* 2000; 39: 627-633

Thomson G, Gagnon AN. Canine Gastroenteritis Associated with a Parvovirus-like Agent. *Can Vet J* 1978; 19: 346

Truyen U, Parrish CR. Canine and Feline Host Ranges of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus: Distinct Host Cell Tropisms of Each Virus In Vitro and In Vivo. *J Virol* 1992; 66: 5399-5408

Ventre K, Randolph AG. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 (1) CD000181

Vincente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human Bocavirus, a Respiratory and Enteric Virus. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 636-637

Völz S, Schildgen O, Klinkenberg D, Ditt V, Müller A, Tillmann RL, Kupfer B, Bodo U, Lentze MJ, Simon A. Prospective study of Human Bocavirus (HboV) infection in a pediatric university hospital in Germany 2005/2006. *J Clin Virol* 2007; 40: 229-235

Wedzicha JA. Role of Viruses in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 115-120

Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, Kreth HW. Frequent Detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 109

Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hübinger M, Gelkowski T, Glatzel M, Lentze J, Bode U, Simon A. Human metapneumovirus infection cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr* 2006; 165: 467-475

Williams JV. The clinical presentation and outcomes of children infected with newly identified respiratory tract viruses. *Infect Dis Clin North Am* 2005; 19: 569-584

Welliver RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 6-12

Zielen S, Herting E, Rolandt F, Forster J. Prophylaxe von schweren RSV-Erkrankungen bei schweren Risikokindern mit Palivizumab – Leitlinie Nr. 048/012. In: Deutsche Gesellschaft für Pädiatrie, Arbeitsgemeinschaften der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften, Hrsg. AWMF online.

Html Code <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/048-012.htm>; 22.11.2006; 12:40:23

Danksagungen

Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. Oliver Schildgen für die Betreuung dieser Studie und Herrn PD Dr. Arne Simon für die Unterstützung bei allen klinischen Aspekten dieser Arbeit.

In der virologischen Arbeitsgruppe gilt mein Dank vor allem Frau Ramona Liza Tillmann für ihre Hilfe und Verständnis bei den experimentellen Laborarbeiten und Frau Vanessa Ditt.

Dem Team der Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Universitätskinderklinik Bonn - vor allem Herrn Dr. Norbert Heinrich - danke ich für die Heranführung an das pädiatrische Denken und Arbeiten.

Frau Dr. Anja von Renesse danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Stellvertretend für zahlreiche Freunde, danke ich hier G. Schäfer, L. Weber, K. Boock,

M. Wasylciw und natürlich meinen Bruder Jonas Klinkenberg für das Korrekturlesen und die Unterstützung, ohne die ich diese Arbeit nie zu Ende gebracht hätte, sowie Herrn Dr. M. Möhlenbruch und Herrn P. Hoffmann für Inspiration und „an die Hand nehmen“.